

# A csontpótlás klinikai és kísérletes vizsgálata

Doktori értekezés

**Dr. Szalay Krisztián**

Semmelweis Egyetem  
Klinikai orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Szendrői Miklós, az MTA doktora, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Pánics Gergely, Ph.D., egyetemi adjunktus  
Dr. Böröcz István, Ph.D., osztályvezető főorvos

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Lakatos Péter, az MTA doktora, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Pap Károly, Ph.D., egyetemi adjunktus

Dr. Klára Tamás, Ph.D., főorvos

Budapest  
2017

## Tartalomjegyzék

<b>Rövidítések jegyzéke.....</b>	<b>4</b>
<b>1. Bevezetés .....</b>	<b>6</b>
1.1 Áttekintés .....	6
1.2 A csontról általánosságban .....	8
1.3 Különböző csontformák, csontképződés, csontnövekedés .....	10
1.4 Fiziológiás csontgyógyulás .....	13
1.5 Álízületek .....	14
1.6 Álízületek diagnosztikája és kezelése .....	16
1.7 Csontpótlás .....	17
1.8 Kalciumfoszfát kerámiák .....	22
1.9 A kalciumdeficiens hidroxiapatit (CDHA) kerámiák tulajdonságai és felhasználási lehetőségei.....	24
1.10 Csontpótló anyagok története, időrendi áttekintése .....	25
1.11 Mezenchimális őssejtek .....	26
1.12 Sejttenyésztő médiumok .....	30
1.13 Trombocitában gazdag plazma .....	31
1.14 Mátrixok sejttel való bevonása .....	34
1.15 Csontpótló anyagok vizsgálatához alkalmas állatmodellek áttekintése .....	35
1.16 Az óriássejtes csonttumor .....	36
1.16.1 Bevezetés.....	36
1.16.2 Történeti áttekintés, klasszifikáció, epidemiológiai adatok.....	36
1.16.3 Klinikai tünetek, klinikopatológiai vonatkozások.....	38
1.16.4 Radiológiai jellemzés.....	39
1.16.5 Patológia .....	40
1.16.6 Az óriássejtes csonttumor sebészi kezelése.....	43
1.16.7 Az óriássejtes csonttumor szisztémás kezelése.....	45

1.16.8	Az óriássejtes csonttumor radioterápiája.....	46
1.16.9	A malignus óriássejtes csonttumorok kezelése.....	47
<b>2.</b>	<b>Célkitűzések</b> .....	<b>48</b>
<b>3.</b>	<b>Módszerek</b> .....	<b>50</b>
3.1	Beteganyagunk klinikai vizsgálata .....	50
3.2	Kísérleti állatok .....	53
3.3	A kerámia .....	54
3.4	PRP előállítása .....	54
3.5	Mezenchimális eredetű őssejtek izolálása és tenyésztése .....	55
3.5.1	Sejttenyésztés általános feltételei .....	55
3.5.2	Tenyésztő oldat .....	55
3.5.3	Mezenchimális eredetű őssejtek izolálása .....	57
3.5.4	Élő sejtek számolása .....	61
3.6	Sejtek felvitele a CDHA kerámia felszínére és a PRP használata .	61
3.7	A műtét .....	62
3.8	Kísérleti terv .....	67
3.9	Radiológiai utánkövetés .....	68
3.10	Biomechanikai vizsgálat .....	68
3.11	Mikro-CT vizsgálat .....	70
3.12	Szövetteni analízis .....	72
3.13	Statisztikai analízis .....	78
<b>4.</b>	<b>Eredmények</b> .....	<b>79</b>
4.1	Beteganyagunk klinikai utánkövetésének eredményei.....	79
4.2	Biomechanikai eredmények .....	81
4.3	Csont térfogat és CDHA kerámia rezorpció mikro-CT-vel mérve .....	82
4.4	Szövetteni eredmények .....	86
<b>5.</b>	<b>Megbeszélés</b> .....	<b>90</b>
5.1	Klinikai eredményeink megbeszélése.....	90
5.2	Kísérletes eredményeink megbeszélése .....	97
<b>6.</b>	<b>Következtetések</b> .....	<b>108</b>
<b>7.</b>	<b>Összefoglalás (magyar és angol nyelven)</b> .....	<b>111</b>

<b>8.</b>	<b>Irodalomjegyzék.....</b>	<b>113</b>
<b>9.</b>	<b>Saját publikációk jegyzéke.....</b>	<b>135</b>
<b>10.</b>	<b>Köszönetnyilvánítás .....</b>	<b>138</b>

## Rövidítések jegyzéke

$\mu$ -CT: micro-computer tomography

$\beta$ -TCP:  $\beta$ -trikálcium-foszfát

ANOVA: többváltozós varianciaanalízis

BMPs: bone morphogenetic proteins

BMSCs: bone marrow stromal cells

BSE: szivacsos agyvelőgyulladás

CDHA: calcium-deficient hydroxyapatite, kálcium-hiányos hidroxipatit

CPZ: kálciumfoszfát cement

CT: computer tomography

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle médium

ECGF: epithelial cell growth factor

EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav

EGF: epidermal growth factor

ESC: embrionális őssejt

FCS: magzati borjúsérum

FGF: Fibroblast Growth Factor

HA: hidroxipatit

HIF: hypoxia-inducible factor

high-SSA: nagy specifikus felületű

HLA: human leukocyte antigen

hTERT: human telomerase reverse transcriptase

IGF: Insulinlike Growth Factor

IGF: insulin-like growth factors

low-SSA: kis specifikus felületű

M-CSF: macrophage colony stimulating factor

MPS: mononukleáris fagocitarendszer

MRI: Magnetic Resonance Imaging

MSC: mesenchymal stem cells, mezenchimális őssejt

MSTS: Musculoskeletal Tumor Society, Muszkuloszkeletális Tumor Társaság

NZWR: új-zélandi fehér nyúl

PBS: foszfáttal pufferált sóoldat

PCL-TCP: policaprolakton-trikálciumfoszfát

PDGF: platelet-derived growth factor

PMMA: polymetil-metakrilát

PRP: platelet-rich plasma, trombocitában gazdag plazma

RANKL: Receptor activator for nuclear factor  $\kappa$  B ligand

SCID: severe combined immunodeficiency

SSA: specifikus felület

TAS: telomerikus asszociációk TAS

TCP: trikálciumfoszfát

TE: Tissue Engineering, szövettenyésztés, szövetmérnökség, szövetépítés

TGF- $\beta$ : transforming growth factor- $\beta$

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

# 1. Bevezetés

## 1.1 Áttekintés

A masszív csontdefektusok a mai napig komoly problémát jelentenek a rekonstruktív sebészet számára. Az autológ spongióza használata maradt az egyedül igazán hatékony módszer csontdefektusok kitöltésére. Az autológ csont egyrésztől háromdimenziós mátrixot biztosít a belenövő új csont és a bevándorló oszteogén sejtek számára (oszteokonduktív tulajdonság), másrésztől növekedési faktorokat (oszteoinduktív tulajdonság) és sejteket tartalmaz (oszteogén tulajdonság) nagy mennyiségben (Fleming és mtsai 2000). Komoly probléma azonban ezzel a módszerrel, hogy csak korlátozott mennyiségben áll rendelkezésre a felhasználható spongiózus csont, a csontvétel helyén pedig gyakran alakul ki szövődmény (Arrington és mtsai 1996, Damien és mtsai 1991). Ennek megfelelően a szövetmérnökség, szövetépítés (tissue engineering) egyik legintenzívebben kutatott területe a csontgyógyulás és a csontpótlás. A szövetépítés alappillérei: a scaffoldok, a sejtek és a növekedési faktorok.

A biokerámiák a csontpótlás ígéretes lehetőségei, mert háromdimenziós teret biztosítva lehetővé teszik a sejtek proliferációját, differenciációját, és ezáltal az új csont képződésének a lehetőségét biztosítják. Ma már sokféle felszívódó és oszteokonduktív tulajdonságú csontpótló anyag érhető el, számos közülük már a klinikai gyakorlatban is használt (Petite és mtsai 2000, Wiltsfang és mtsai 2004). A leggyakrabban használt ezek közül a szintetikus  $\beta$ -trikálcium-foszfát ( $\beta$ -TCP) és a korallokból származó kálciumfoszfát. Ezen anyagok legnagyobb hátránya az alacsony specifikus felület (low specific surface area), mely kisebb  $1 \text{ m}^2/\text{g}$ -nál. A kálcium-hiányos hidroxipatit kerámia (CDHA) az új generációs nagy specifikus felületű (high-SSA) kerámiák közé tartozik a maga  $20\text{--}80 \text{ m}^2/\text{g}$  specifikus felületével, megközelítve ezzel a normál csontszövet  $80 \text{ m}^2/\text{g}$  specifikus felület értékét. A sejtek sokkal könnyebben tapadnak meg a nagy specifikus felületű kerámiákon (high-SSA), mint a kis specifikus felületűeken (low-SSA) (Kasten és mtsai 2003).

Az oszteogén potenciál növelése érdekében a scaffoldok kombinálhatóak mezenchimális őssejtekkel (MSC) és növekedési faktorokkal. A mezenchimális őssejtek multipotens sejtek és egyaránt tudnak oszteoblaszt, kondrocita, adipocita, tenocita és

mioblaszt irányba differenciálódni (Prockop és mtsai 1997). A mezenchimális őssejtek csontvelő aspirátumból könnyen izolálhatóak, és in vitro körülmények között tenyésztethetők. Számos preklinikai állatkísérlet igazolja, hogy in vitro expandált mezenchimális őssejtek csontpótló anyagokkal kombinálva kritikus méretű csontdefektusok gyógyulásában pozitív hatással bírnak (Petite és mtsai 2000, Quarto és mtsai 2001).

A növekedési faktorok befolyásolják a kemotaxist, a differenciációt, a proliferációt és a csontsejtek szintetikus aktivitását, ezáltal szabályozva a fiziológias remodellinget és a törésgyógyulást. Számos növekedési faktornak van stimuláló hatása a csontgyógyulásra, ilyenek például a bone morphogenetic proteins (BMPs), a trombocita eredetű növekedési faktor (platelet-derived growth factor (PDGF)), a transzformáló növekedési faktor- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )), és az inzulinszerű növekedési faktorok (insulin-like growth factors, IGF) (Bostrom és mtsai 1999). A thrombocytában gazdag vérplazma ezeket a növekedési faktorokat (PDGF, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, IGF, epidermikus növekedési faktor (epidermal growth factor, (EGF)) és az epitheliális növekedési faktor (epithelial cell growth factor (ECGF)) természetes összetételükben tartalmazza (Kiuru és mtsai 1991). Mivel a PRP autológ módon előállítható, így további előnye, hogy az esetleges fertőző betegségek átvitelétől nem kell tartani. Egyszerűen és gyorsan, két centrifugálási lépésben előállítható a saját vérből a felhasználás helyén és idején. Az alap kutatások igazolják, hogy a PRP serkenti a csont és a lágyrészek gyógyulását (Wiltfang és mtsai 2004, Kawase és mtsai 2003). Marx és munkatársai PRP-t használtak trombocita eredetű növekedési faktorok forrásaként szájsebészeti csontdefektusok pótlása során, és azt találták, hogy az autológ csonttranszplantátumok gyorsabban beépültek, valamint a csont denzitása is magasabb lett a PRP hatására (Marx és mtsai 1998). Az utóbbi időben azonban egyre több az ellentmondásos publikáció a PRP hatását illetően, és továbbra sincs egyetértés a csontregenerációban betöltött pontos szerepéről (Choi és mtsai 2004, Gandhi és mtsai 2006, Li és mtsai 2004, Roldan és mtsai 2004, Yamada és mtsai 2004).

Kísérletes munkánk első felében egy mindennapos klinikai probléma ismertetésén keresztül szeretnénk felhívni a figyelmet a modern csontpótló anyagok fejlesztésének szükségességére. Retrospektív vizsgálatunk célja az volt, hogy megfigyeljük és összehasonlítsuk a szubkondráisan elhelyezkedő óriássejtes



csonttumorok kikaparása után kialakult üreg kitöltésére használt eltérő sebészeti technikákat, valamint a zömített csontforgács és csontcement hatását az alsó végtagi teherviselő ízületekben kialakuló szekunder degeneratív elváltozásokra. Az eltelt néhány évben lefolytatott vizsgálataink során intézetünkben, a Semmelweis Egyetem Általános Orvostudományi Karának Ortopédiai Klinikáján általunk kezelt, intézetünk Csonttumor Regiszterében nyilvántartott, rendszeresen ellenőrzött betegeink anyagát dolgoztuk fel.

Tudomásunk szerint csak szórványos ismeretek vannak a trombocitában gazdag plazma esetleges felhasználásának lehetőségeiről a kritikus méretű csontdefektusok gyógyításában. Ezért úgy döntöttünk, hogy munkánk második felében megvizsgáljuk a PRP hatását a kritikus méretű csontdefektus gyógyulására autológ mezenchimális őssejtekkel és a fent említett nagy specifikus felületű CDHA kerámiával kombinálva. Vizsgálatunkhoz egy új-zélandi fehér nőtény nyúl radiuszán kialakított kritikus méretű diafizális csontdefektusmodellt választottunk. A főbb vizsgált paraméterek pedig a csontosodást követő biomechanikai stabilitás, az újonnan képződött csont mennyisége és a beültetett kerámia felszívódásának mértéke voltak, melyeket négy pontos nem destruktív hajlítási vizsgálattal, micro-CT vizsgálattal és szövettani vizsgálattal határoztunk meg.

## 1.2 A csontról általánosságban

Emlősökben, így az emberben is a csontvázrendszer, amely passzív mozgásszerv, a szervezet szilárd vázát alkotja. További feladata a központi idegrendszer és a mellkasi szervek védelme. A vázrendszer egy metabolikusan igen aktív szerv, melyben az élet folyamán folyamatos átépülés megy végbe, és az ásványi anyagok homeosztázisában is döntő szerepet tölt be (Ng és mtsai 1997). Az emberi testben előforduló kalcium 99 százaléka hidroxipatit formájában a csontos vázban raktározódik (Junqueira és mtsai 2002). Fontos továbbá, hogy helyet biztosít a vérképzésnek, azaz helyet ad a vörös csontvelőnek, így kialakítva az oszteohematopoetikus egységet. Az emberi test 206 különálló csontot tartalmaz. Alak szerint megkülönböztetünk csöves, lapos, köbös és labirintusos csontokat.

A csontalapállomány organikus és anorganikus összetevőkből áll. Organikus összetevők az oszteokollagén és a glikoproteinek, melyek a csont zsírmentes szárazanyagának közel 35 százalékát teszik ki. Az anorganikus összetevők fő részét a hidroxiapatit  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$  kristályai képezik. A további anorganikus összetevők vagy ebbe a kristályrácsba épülnek be (fluor), vagy a kristályok felszínén abszorbeálódnak (magnézium, nátrium). Az anorganikus anyagok a csont zsírmentes szárazanyagának közel 65 százalékát teszik ki.

A legfontosabb csontképző sejtek az oszteoblasztok. Mezenchimális sejtekből differenciálódnak progenitor oszteogenetikus őssejteken keresztül oszteoblasztá. A sejtek a csont felszínén helyezkednek el, és ott szintetizálják és szecernálják a csontmátrix organikus komponenseit. A még nem kalcifikálódott csontmátrixot oszteoidnak nevezzük. Csak ezután kezdődik meg a különböző anorganikus anyagok lerakódása a mátrixban, mint például a kalciumfoszfát, kalciumkarbonát és ennek segítségével indul meg a támasztó és védelmi funkciót ellátó csont keménységének kialakulása (Junqueira és mtsai 2005).

Az organikus mátrix mineralizációja után az oszteoblasztok mintegy befalazódnak a csontlakunákban. Ezeket a befalazódott sejteket nevezzük oszteocitáknak. Ezek a sejtek hosszú citoplazmatikus nyúlványaikon keresztül kapcsolatban vannak egymással, a csontfelszínen fekvő oszteoblasztokkal és az ellátó, tápláló erekkel. Ezen a finom citoplazmatikus hálózaton keresztül történik a csont táplálása és ez a hálózat fontos szerepet játszik a csont ásványianyag egyensúlyának szabályozásában (Junqueira és mtsai 2002).

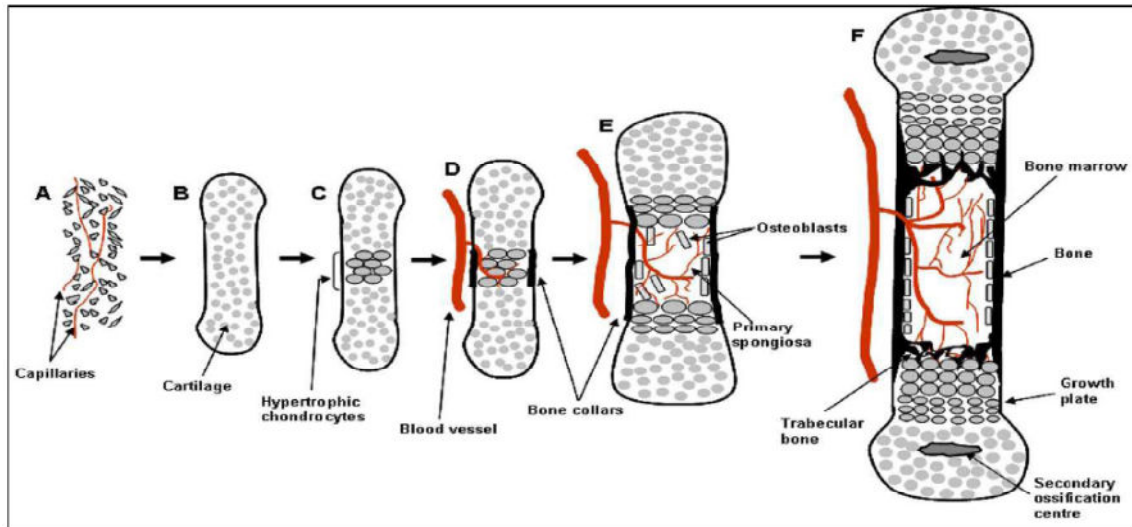
Az oszteoklasztok olyan többmagvú óriássejtek, melyek a csont, a csontépítés mellett folyamatosan zajló fiziológiás lebontás folyamatáért felelősek. Az oszteoklasztok a szervezet mononukleáris fagocitarendszeréhez (MPS) tartoznak. A csontok felszínéhez kötődnek és proteolitikus enzimeket adnak le, melyek segítségével feloldják a hidroxiapatit kristályokat, ezzel elősegítik a csont demineralizációját. A szabaddá váló kollagén rostokat proteáz segítségével bontja le. Egységnyi idő alatt egy oszteoklaszt háromszor annyi csontmátrixot bont le, mint amennyit egy oszteoblaszt termel (Junqueira és mtsai 2002).

### 1.3 Különböző csontformák, csontképződés, csontnövekedés

Szövettanilag hálózatos, fonatos és lamelláris csontot különíthetünk el egymástól. A fonatos csont fejlődéstörténetileg egyszerűbbnek, ősbibnek tekinthető csontforma, mely nem más, mint elcsontosodott kötőszövet, mely hosszabb ideje fennálló húzó- és nyomóerők hatására alakul ki. Ez a csontforma képződik minden új csont fejlődése során (oszteogenezis, törésgyógyulás). Az embrionális fejlődés során kialakult fonatos csontot a születés után differenciáltabb lamelláris csont váltja fel. A lamelláris csont legkisebb építési egysége az oszteon vagy Havers-rendszer. Számos, koncentrikusan elhelyezkedő csontlamellából áll (Havers-lamellák), melyek belsejében egy kötőszövettel, erekkel, idegekkel kitöltött csatorna, a Havers csatorna fut. A lamellák egymással párhuzamosan futó kollagénrostokból és elmeszesedett csontalapállományból állnak. Ezeket oszteoblasztok és azok citoplazmatikus nyúlványrendszeri szabdalják fel. A kollagénrostok lefutásának iránya lamellánként változik és így egymást hegyesszögben metsző térbeli hálózatok jönnek létre. A Havers-csatornában futó erek kapcsolatban vannak a velőüreggel, a perioszteummal és az oszteonok között futó Volkmann csatornákon keresztül egymással is. A csont külső és belső felszínén a lamellák lemezszerűen rétegződnek. A legkülső, úgynevezett alaplamella körbeöleli az egész csontot és direkt a perioszteum alatt helyezkedik el. A legbelső alaplamella pedig mintegy elválasztja a csontot a csontvelőtől. Ezen a módon, szép lassan az oszteonok beépülnek a fonatos csontba mindaddig, míg az teljesen el nem tűnik és helyét teljes egészében a lamelláris szerkezetű csont veszi át (Junqueira és mtsai 2002). A szkeletális rendszer a növekedés lezárulta után, egész életünk során folyamatosan átépül, ami ahhoz vezet, hogy közel tíz évenként teljesen megújul (Manolagas 2000).

A csontfejlődésben megkülönböztetünk elsődleges, direkt, úgynevezett angiogén csontosodást, valamint indirekt, másodlagos csontosodást. A direkt csontosodás során a csontszövet direkt a mezenchimális kötőszövetből alakul ki anélkül, hogy átmeneti támasztószövet jönne létre. Ennek a csontosodási formának magasabb rendű szervezetekben csak alárendelt gyakorlati jelentősége van. Eltört csontok törtvégeinek igen pontos egybeillesztése és tökéletes rögzítése mellett a keletkezett keskeny csonthézag gyógyul ilyen folyamattal. Az indirekt csontosodás egyik fajtája a

dezmogén csontosodás, melynek lényege, hogy az előzetesen kifejlődött kollagénszövetes telep csonttá épül át. Így alakulnak ki például a koponyatető csontjai, de a csonttörés gyógyulása is ebbe a csoportba tartozik. Az indirekt csontosodás másik fajtája, az enkondrális csontosodás során először egy porcos modell képződik, melyet később csontszövet helyettesít (Liebich 1999). Mindkét csontképződési folyamatban elsőként fonatos csont alakul ki, melynek alapállományában elhelyezkedő kollagénrostok még rendezetlenül futnak. Ez a csont később a stabilabb szerkezetű lamellaris csonttá alakul, ahol a kollagénrostok már egy meghatározott rend szerint futnak le. (Junqueira és mtsai 2002). A hosszú csöves csontok fejlődése során egy hialinporcából álló modell átalakulása zajlik le. A csöves csontok porctelepei hosszmetsetben „piskóta” alakúak. A széli részeken a perikondriumból, majd a perioszteumból dezmális csontosodással kialakul egy csontmandzsetta, kialakítva a diafizális részt, majd ez a folyamat a diafízis irányából mindkét epifízis felé terjed. A csontosodás előrehaladtával az alatta fekvő porcsejtek hipertrofizálódnak, a köztük lévő porcos alapállomány csökken, és megkezdődik az elmeszesedés. A csontmandzsettán keresztül erek nőnek a diafízis belseje felé, melyeken keresztül a porc lebontásában fontos szerepet játszó kondroklasztok vándorolnak be. A porcsejtek pusztulása után visszamaradt részekből képződik az elemi velőűr, melyből későbbiekben alakul ki a csontvelőt is tartalmazó definitív velőűr. Ezzel párhuzamosan differenciálódnak mezenchimális sejtekből az oszteoblasztok, és megkezdik a csontmátrix termelését. Ennek köszönhetően a maradék elmeszesedett porcos részeken fonatos csont képződik. Ezzel egyidőben és valószínűleg ennek hatására a szomszédos porcállományban is igen élénk szövetszaporodási és egyúttal degenerációs jelenségek tapasztalhatóak. A mezenchimális elemeknek az elfajult és elpusztult porcsejtek helyére való behatolása és a megmaradó porc-alapállományra történő csontképzés adja a kondrogén csontosodás fő mechanizmusát. Az eredeti porctelep további alakulásában újabb lépés, hogy a csont két végdarabjának porctelepében az előbb leírt folyamattól függetlenül, de hasonló mechanizmussal csontképzési góc alakul ki. Itt is egy érhurok tör be a végdarabba, melynek segítségével mezenchimális sejtek vándorolnak be. Az elfajult porcsejteket elpusztítják és beindul a már korábban ismertetett kondrogén csontosodás. Az epifízis és a diafízis felől induló csontosodás határán a növekedés lezárultáig megtalálható egy néhány milliméter vastag porclemez (1. ábra) (Liebich 1999, Junqueira és mtsai 2002).



**1. ábra**

***A hosszú csöves csontok fejlődése***

- A. mezenchimális sejtömörülések alakulnak ki a kapillárisok környezetében*
- B. hialinporcból álló modell formálódik*
- C. csontosodás indul a perikondriumból, porcsejtek hipertrofizálódnak,*
- D. csontmandzsettán keresztül erek nőnek a diafízis belseje felé*
- E. a porcsejtek pusztulása után visszamaradt résekből képződik az elemi velőűr, differenciálódnak mezenchimális sejtekből az oszteoblasztok, és megkezdik a csontmátrix termelését*
- F. a csont két végdarabjának porctelepében az előbb leírt folyamattól függetlenül, de hasonló mechanizmussal csontképzési góc alakul ki, kialakulnak a növekedési porclemezek*

*(Junqueira és mtsai 2002)*

## 1.4 Fiziológiás csontgyógyulás

A többi szövettel ellentétben, melyek integritásuk sérülése esetén csak hegsszövet segítségével képesek regenerálódni, a csontszövetnek megvan az a képessége, hogy teljes mértékben hegképződés nélkül tud regenerálódni (Glowacki 1998). A csontgyógyulás egy igen komplex folyamat, mely a sejtes elemek mellett számos más faktortól, mint például növekedési faktoroktól, citokinektől is függ. A csontképződés indulhat a perioszteum felől, az endoszteum felől és a Havers-rendszer felől. Kétféle csontgyógyulást különböztetünk meg egymástól, a primert és a szekundert (Niethard és mtsai 2003).

A primer csontgyógyulás a csontgyógyulás egy mesterséges formája, mely csak akkor lép fel, amikor a törési felszínek egymáshoz nagyon közel fekszenek ( $< 1\text{mm}$ ). Ez a gyógyulási forma hasonlóképpen zajlik, mint a fiziológiás remodelling, a törési rést kitöltő, áthidaló kalluszképződés nincs. Az oszteoklasztok lebontják az elhalt csontot a törési felszín mentén és az oszteoblasztok oszteoiddal töltik ki a rést. Ez az úgynevezett kontaktgyógyulás operatív töréskezelést követően érhető el különféle oszteoszintézisek után, az érintett terület nyugalomba helyezésével.

Ha a csontvégek egymástól több mint 1 mm-re eltávolodnak, akkor a primer csontgyógyulás nem tud megvalósulni, ebben az esetben következik be a szekunder csontgyógyulás, mely az igazi biológiai csontgyógyulás. A biológiai oszteoszintézis során tehát a csont hossza, iránya, integritása anélkül áll helyre, hogy magát a törést sebészileg feltárnánk. Az érellátás ilyenkor nem sérül, a természetes csontgyógyulás beindulhat. Négy egymást átfedő fázist különböztetünk meg a szekunder csontgyógyulás során (Carano és mtsai 2003):

1. Kezdeti szakaszban a sérült erekből kialakul egy törési hematóma, melyet egy helyileg kialakuló komplex gyulladásos folyamat lebont. Ez a gyulladásos folyamat a törés kialakulása után 8 órával kezdődik és időtartama a törés kiterjedésétől (törési felszínek mértéke, lágyrészkárosodás mértéke) függ.
2. A kötőszöveti kallusz szakaszban az újonnan képződött ereken, melyek a perioszteális szövetből és a velőüreg felől törnek a törési részbe, pluripotens őssejtek áramlanak be. Ezek a sejtek később fibroblaszt, kondroblaszt és oszteoblaszt irányba is tudnak differenciálódni. Képződik tehát a törtvégek

között egy granulációs szövet, mely szép lassan egy fibrózus-porcos-csontos szövetté alakul át, az úgynevezett kötőszöveti kallusszá. Ez a szövetkapocs a törtvégeket stabilizálja, közöttük a mozgásképesség jelentősen csökken.

3. A következő fázis a csontos kallusz fázisa. A kalciumkristályok lerakódásával megkezdődik a fibrózus kallusz mineralizálódása. Ez a csont még fonatos szerkezetű. Ez már egy fix, erős mechanikai kapcsolatot jelent a törés után 6 héttel a törtvégek között. Axiális irányú terhelhetőség csak a törés után 2 hónappal jelenik meg.
4. Az átépülési fázisban a növekedő mechanikai terhelés alatt a fonatos csontszerkezet fokozatosan a végleges lamelláris csonttá alakul. Az új érképződés egészen addig tart, amíg a törés előtti állapot helyre nem áll. A csont az átépülési fázis végén eléri közel normális morfológiáját és mechanikai stabilitását.

Ha a csontgyógyulás 3-4 hónapnál tovább tart, akkor elhúzódó csontgyógyulásról (delayed-union), ha fél évnél is tovább tart, akkor pedig elmaradó csontgyógyulásról, álízületről (pseudoartrózis) beszélünk (Niethard és mtsai 2003).

## 1.5 Álízületek

Álízületről akkor beszélünk, ha a két törtvég között hat-nyolc hónap után sem jön létre kielégítő csontos összeköttetés. Az álízület kialakulásának lehet mechanikai és biológiai oka.

Az álízület-képződés vezető mechanikai oka a lokális instabilitás a törés területén, valamint a folyamatos nyíró és kompressziós erők jelenléte. A legfontosabb biológiai faktor pedig a vérrellátás jelentős sérülése a törés területén, amely miatt akár teljesen devitalizált csontrészek alakulhatnak ki. Álízület-képződéséhez vezethet továbbá a törés területén kialakult infekció és a szövetek vitalitásának csökkenését okozó általános faktorok (betegek életkora, cukorbetegség, tartós gyógyszerszedés például szteroid, röntgensugárzás (Niethard és mtsai 2003)).

Az álízületek Weber és Cech (1976) szerinti beosztását a mai napig elterjedten használjuk. A beosztás alapja az álízület vitalitása (Jones és mtsai 2005), amely szerint 3 különböző csoportot különböztetünk meg egymástól:

1. Hipertróf álízület esetén biológiailag reakcióképes, vitális álízületről van szó. A két törtvég között terjedelmes kalluszképződés figyelhető meg érdemi elcsontosodás nélkül. A kialakult szövet minden esetben jól vaszkularizált. A vezető ok általában a hiányzó stabilitás és a törtvégek nyugalomba helyezésének hiánya.
2. Oligotróf álízület esetén a törtvégek között ereken gazdag, de a hipertróf álízületnél kevesebb mennyiségű kötőszövet borítja a törtvégeket. Csak kevés kallusz képződik. Az ok ezen esetek egy részében biológiai, más részében biomechanikai, megint más részében tisztán mechanikai.
3. Az atrofias álízület biológiailag reakcióképtelen, avitális. A törés területén avaszkuláris fragmentek vannak, így semmiféle szöveti reakcióra sem lehet számítani. Az álízület területén nem lehet kalluszképződést megfigyelni és a csontfragmentumok atrofizálódnak. Kialakulhat szekveszterképződés, nekrosis, gyulladás vagy metabolikus zavar következményeként. Gyógyulás csak a gyulladás szanálásával, avitális csontok eltávolításával és az érképződés stimulálásával érhető el. Az avitális álízület a leggyakoribb álízület, mely törések után kialakulhat, és az álízületek 80 százaléka tartozik ebbe a csoportba.

KUNER és munkatársai (1996) az avitális álízületeket további 3 csoportba osztották. A fentebb említett atrofias álízületféleség mellett megkülönböztet még rotációs (Drehkeilpseudarthrose), csavarásos álízületet és defektálízületet. Az előbbinél egy interfragmentális darab elveszíti keringését és nekrotikus lesz. Az instabilitás gátolja, késlelteti a revaszkularizációt. A defektálízület lényege a csont anyagihiánya, és így hiányzik a szegmensek egymás közti kontaktusa. A szegmensek vérellátása jó, de a defektzóna oszteológiailag avitális. Ez a fajta álízület jelenti a legnagyobb kihívást orvosiilag, mert az új csontképződés serkentése mellett a nagyobb csontdefektust csonttranszplantátummal vagy csontpótló anyaggal kell áthidalni.



## 1.6 Álízületek diagnosztikája és kezelése

Egy álízület radiológiai jele a hiányzó csontos átépülés, de fontos tudni, hogy definíció szerint az álízület kifejezés hisztomorfometriai jellemzőkön alapul. Az álízület területén a kötőszövet ízületi szinoviális bolyhokhoz, hialin és rostos porchoz hasonló irányba differenciálódik (Brandner és mtsai 2001).

Az álízület kezelési stratégiája függ az etiológiájától. Vannak álízületek, melyek konzervatív kezeléssel gyógyíthatóak, de a legtöbb esetben valamilyen sebészi eljárásra van szükség (Jones és mtsai 2005). Hipertróf álízület esetén a mechanikai zavaró tényező megszüntetése a cél egy stabil belső (lemezes oszteoszintézis, velőűrszeg) vagy külső (fixateur extern) rögzítéssel. Nagyobb problémát jelent az avitális álízület. Itt a műtéttel nem csak stabilitást kell elérni a törtvégék között, hanem biztosítani kell a fragmentumok területének vérellátását is. Amennyiben nagyméretű csonthiány miatt alakult ki az álízület, akkor a csontdefektust csonttranszplantátummal vagy szegmenttranszporttal kell áthidalni (Niethard és mtsai 2003).

A csontgyógyulás elősegítése szempontjából a különböző implantátumoknak és beavatkozásoknak három fontos tulajdonsággal kell rendelkezniük (Lane és mtsai 1987):

1. oszteogén tulajdonság: a csontújdonképződés egy adott implantátum túlélő sejtjeiből indul ki. Ilyen például az autológ spongióza átültetés, az allogén csontátültetés vagy az autológ csontvelő átültetés.
2. oszteokonduktív tulajdonság: az implantátum mintegy háromdimenziós vázként szolgál, melybe oszteoprogenitor sejtek vándorolnak be a perivaszkuláris szövetekből benőtt kapillárisokon keresztül. Ezek az anyagok az extraszkeletális rendszerben, maguktól csontképzésre nem alkalmasak. Felületük azonban rendelkezik azokkal a kémiai és fizikai tulajdonságokkal, melyek lehetővé teszik az itt megtelepedő sejtek osztódását, differenciálódását.
3. oszteoinduktív tulajdonság: ezen implantátumokban induktív stimulus hatására a benne lévő progenitor sejtek oszteoblasztokká differenciálódnak. Ezek az anyagok a szkeletális rendszeren kívül is képesek újcsontképzésre. Jellemzően ilyen hatást tudnak kifejteni a növekedési faktorok és az immunmodulált

citokinek, melyek hatására az adott implantátumon belül végbemegy a differenciálódás.

## 1.7 Csontpótlás

Nagyméretű csontdefektusok pótlása az ortopédia és a traumatológia egyik legnehezebben megoldandó problémái közé tartozik. Sokszor csak nagy nehézségek árán, többszöri műtéttel lehet a csontgyógyulást elérni (Puelo és mtsai 2003). Romtörések, veleszületett csontdeformitások, gyulladásos csontfolyamatok és csontot érintő tumorok gyakran okoznak nagyméretű, nehezen gyógyítható csontdefektusokat (Arinze és mtsai 2003). Egyre több olyan esetben próbálunk végtagmegtartó műtétet végezni, melyeknél korábban amputációt végeztünk.

A végtagmegtartás növekedésével egyre több kritikus méretű csontdefektust kell kezelünk (Rueger és mtsai 1998), ennek megfelelően jelentősen megnőtt az igény az elmúlt évtizedekben a szkeletális rekonstrukcióhoz alkalmas csonttranszplantátumok, csontpótló anyagok iránt. Az Egyesült Államokban évente több mint 6 millió törést kezelnek és körülbelül az esetek tíz százalékában lép fel valamilyen szövődmény a gyógyulás során. Ezekben az esetekben gyakran van szükség valamilyen csontátültetésre, illetve valamilyen csontpótló anyag, módszer alkalmazására. Összeségében az Egyesült Államokban évente körülbelül félmillió különbözőfajta csonttranszplantációt végeznek (Greenwald és mtsai 2006). Németországban évente közel 10 ezer alkalommal végeznek autológ vagy allogén csonttal defektuskitöltést (Rueger és mtsai 1998).

Közel 50 éve számít az autológ, csípőlapátból származó spongiózaátültetés a csontdefektuskezelés aranystandardjának (Hauschild és mtsai 2005). Autológ transzplantátum alatt egy darab, a saját szervezetből származó szövetet értünk, melyet ugyanazon individuum eltérő helyére ültetünk át. A spongiózus csont csonttrabekulákban és élő sejtekben gazdag, melyet különböző csontok elsősorban metafizeális részéből nyerünk. A kortikális implantátumok a csont külső, kortikális állományából állnak, melyek a csont merevségeért felelősek. A kortikospongiózus transzplantátumok pedig a fent említett két transzplantátumfajta kombinációja (Slatter 1993). Az autológ transzplantátumok felhasználásának legnagyobb előnye, hogy élő,

saját, csontképzésre alkalmas sejtek kerülnek átültetésre. Ezen kívül az autológ csont egy háromdimenziós mátrixot biztosít az oszteogén sejteknek, melybe az újonnan képződő csont bele tud nőni (oszteokonduktív). Nagy koncentrációban tartalmaz növekedési faktorokat, mint például bone morphogenic proteint (BMPs), melyek elősegítik az új csont képződését (oszteoinduktív). Autológ transzplantáció esetén immunológiai reakciók nincsenek, és fertőző betegségek átvitelére sincs lehetőség (Laurencin és mtsai 2006).

A legfőbb probléma ezzel a módszerrel az, hogy a rendelkezésre álló csont mennyisége erősen korlátozott, és a donor területen gyakran alakul ki fájdalom vagy sebészeti szövődmény (Joshi és mtsai 2004). A csípőlapátból való csontvétel leggyakoribb szövődménye a műtési területen kialakult tartós fájdalom, hematóma, erek, idegek sérülése, peritoneális tér sérülése, az ilioszacrális ízület instabilitása, a spina iliaca anterior superior leszakadása és esetlegesen sérvképződés az adott területen. (Jones és mtsai 2005). Sok esetben a csont kivétele jelentősen növeli a műtési időt, megterhelést jelentve a szervezetnek. Fiatal szervezet esetén a csontkivétel során megsérülhet a nyitott növekedési porc, ezzel pedig sérülhet a csontnövekedés.

A saját csont átültetésének alternatívája lehet az allogén, a xenogén csont, illetve kalluszdisztrakciós eljárások (Rueger és mtsai 1998). Allogén transzplantáció alatt ugyanazon faj egy más egyedéből származó szövet, szerv átültetését értjük (Slatter 1993). Allogén csonttranszplantátumokat már régóta használunk csontdefektusok pótlására. Előnye, hogy nagy mennyiségben áll rendelkezésre, a recipiens szervezetnek nem jelent plusz műtési megterhelést a csont kivétele, kortikális transzplantátumoknál azonnali a mechanikai stabilitás. Hátránya, hogy számos fertőző betegség átvihető ilyen módon (HIV, Hepatitis B, C) (Laurencin és mtsai 2006) és bizonytalan immunológiai reakciók léphetnek fel (Hauschild és mtsai 1996)

Sterilizálás, autoklavozás, besugárzás, liofilizálás, mélyfagyasztás, dekalcinálás és proteinmentesítés segítségével ezen szövődmények esélyét jelentősen lehet csökkenteni (Goldberg és mtsai 1987). Ezek a folyamatok azonban a csontgraftok oszteoinduktív képességének elvesztését is jelentik az azt benépesítő sejtek és növekedési faktorok elpusztításával, tönkretételével (Hallfeldt és mtsai 1995), és jelentősen nő a graftok törékenysége, valamint megváltoznak a graftok felszívódási tulajdonsága is (Laurencin és mtsai 2006). Nem gyakran, de előfordul, hogy a graft

kezelése nem megfelelő, így különböző fertőző ágensek életben maradhatnak, és a donorok szűrésébe is csúszhat hiba. További hátránya, hogy mint avitális, szilárd anyag csak nagyon nehezen és kis mértékben tud átépülni. A normál, saját csonttól való eltérő elaszticitási tulajdonsága miatt a graft területén és a graft-normál csont találkozási területén is fokozott törésveszéllyel kell számolni. (Wiesmann és mtsai 2004). Gyakran látjuk, hogy a graft és a fogadó csont között nem indul meg csontos átépülés, vagy azt, hogy a beültetett csont felszívódik, eltörik (de Boer 1988). Kijelenthetjük tehát, hogy az allogén transzplantátumok gyengébbek, mint az autológ transzplantátumok.

A xenogén transzplantátum egy másik faj egyedéből származó transzplantátum (Slatter 1993). Főleg deminarizált marhacsontról készült csontpótlók vannak a piacon (Endobone; Merck, Németország). Alapjaiban ugyanazok a problémák jelentkeznek felhasználásuk során, mint azt az allogén transzplantátumoknál ismertettük (Hauschild és mtsai 2005).

A kalluszdisztrakció egy ismert eljárás csontdefektusok áthidalására, de technikailag nagy kihívást jelent a sebész számára, az elhúzódó kezelés pedig jelentős megterhelés a betegeknek, és sok szövődménnyel is járhat (Erler és mtsai 2005).

Szükséges tehát új stratégiák kifejlesztése, melyek segítségével a kritikus méretű csontdefektusokat kezelni tudjuk. Az utóbbi időkben egy új, reményteli, interdiszciplináris regeneratív orvostudományi tudományterület indult gyors fejlődésnek, az úgynevezett „Bone-Tissue Engineering“. A Tissue Engineering (TE) kifejezés (szövettenyésztés, szövetmérnökség, szövetépítés) alatt élő szervezeten kívüli, vitális komponensek felhasználásával történő mesterséges szövetpótló anyagok tenyésztését, előállítását értjük. Úgy is fogalmazhatunk, hogy a Tissue Engineering a modern biotechnológia, kémia és mérnöki tudás felhasználása élő szövetek gyógyítása, regenerációja céljából, biológiai pótló anyagok, sejtek és növekedési faktorok felhasználásával. Az elmúlt húsz évben, indulása óta ezen új tudományág rohamléptekben fejlődik. A biológiai anyagok folyamatos kutatása során eljutottunk a tisztán passzív anyagoktól az aktív anyagokig, melyek biológiai környezetükkel kölcsönhatásba tudnak lépni, és képesek implantációs környezetükbe integrálódni (Anderson 2005). Az alapkonceptió a következő: háromdimenziós vázak, sejtek és növekedési faktorok felhasználásával olyan komplex konstrukció jön létre, melynek segítségével kitölthetőek a csontdefektusok, és ezek az aktív komplexek a hiányzó

szöveteket pótolva teljes rekonstrukciót engednek meg. A Tissue Engineering tehát nem csinál mást, mint imitálja mind a mai napig gold standardnak számító autológ spongiózaplasztikát.

Háromdimenziós vázként úgynevezett csontpótló anyagokat használunk. Az ideális csontpótló anyagnak hasonló szilárdságúnak és rugalmasságúnak kell lennie, mint az élő csontnak. Fontos, hogy az anyag felszívódó legyen, de a felszívódás ne legyen túl gyors. Kémiaileg hasonlítson a csontot alkotó anyagokhoz, és ne képezzen lebomlása során toxikus anyagokat, és ne változtassa meg környezetében a pH-értéket. Segítse elő az oszteogén prekursor sejtek növekedését, osztódását, differenciációját. Legyen biokompatibilis, legyen immunológiailag inaktív és ne váltson ki idegentest reakciót. Fiziológias körülmények között ne legyen oldható, vázként a sejtadhéziót, a sejtmigrációt és a sejtproliferációt szolgálja, alakítható legyen, és nagy mennyiségben álljon rendelkezésre (Greenwald és mtsai 2006). Ilyen anyagot, amelynek sokszor egymásnak már-már ellentmondó kritériumnak kellene megfelelnie, a mai napig nem találtak. Sokféle csontpótló anyag van jelen a piacon, de egyik sem közelíti meg a gold standardnak tekintett autológ csonttal elért eredményeket.

A csontpótló anyagokat négy csoportba oszthatjuk:

1. Szintetikus organikus csontpótlók, felszívódó polimerek (például: polilaktid vagy poliglíkol; Immix, Osteobiologics) (Laurencin és mtsai 1996); melyek felszívódásuk során afiziológias pH-értéket okoznak a környezetükben, és ezáltal oszteolízist indukálnak (Kallela és mtsai 1999).
2. Szintetikus anorganikus csontpótlók, mint például kalciumfoszfát kompozitok (OpteMx, Exatech), bioüvegek (Biogran, Orthovita), felszívódó, szinterezett  $\beta$ -trikalciumfoszfát kerámiák ( $\beta$ -TCP) (ChronOs, Synthes), felszívódó, nem szinterezett kalciumdeficiens-hidroxiapatit kerámiák (CDHA), nem felszívódó, szinterezett hidroxiapatit kerámiák (HA) (Calcitite, Centerpulse).
3. Biológiai organikus csontpótlók mint például a kollagén, fibrin, hialuronsav.
4. Biológiai anorganikus csontpótlók, mint például korallból származó hidroxiapatit (Biocoral, Inoteb), a szarvasmarhacsontból szinterezéssel előállított hidroxiapatit (Endobon, Merck; Bio-Oss, Geistlich Biomaterials),

vagy az allogén csontból előállított demineralizált csontmátrix (DBM) (Grafton, Osteotech) (Laurencin et al. 2006).

Ebben a munkában vizsgált kerámiák a második csoportba tartoznak a szintetikus, anorganikus csontpótló anyagok közé. A csontpótló anyagok felhasználása esetén a legtöbb probléma azért lép fel, mert részben a csontdefektus kitöltése után nem sikerül megfelelő stabilitást, szilárdságot elérni (főleg az organikus csontpótlókra jellemző), és mert hiányzik vagy nem megfelelő a beültetett anyag átépülési, lebomlási képessége (ez utóbbi főleg az anorganikus csontpótlókra jellemző).

A csontképzés koncepciója, hogy a transzplantációt túlélő sejtek a fogadó helyen új csontot szintetizálnak, csak friss implantátumok esetén vagy csak autológ csont átültetése esetén működik, mert a többi esetben erős immunológiai reakció lép fel. Egyetlen egy csontpótló anyag esetében sem sikerült még sejtes elemek nélkül oszteoinduktív képességet kimutatni.

Minden csontpótló anyagnak többé-kevésbé van olyan oszteokonduktív képessége, melynek során a háromdimenziós szerkezetbe kapillárisok, perivaszkuláris szövet és mezenchimális sejtek nyomulnak és ott az implantátumot körbevevő csont felől a pórusokba, mint passzív vezetőrácsba a csont benő (Greenwald és mtsai 2006).

A de novo csontképződésben az anyag fajtáján kívül, mely alapvetően meghatározza a felszívódásának sebességét, még fontos szerepet játszik az anyag tisztasága (Lu és mtsai 2002), a felhasznált anyag mennyisége, a felhasznált anyag partikulumainak mérete (Mankani és mtsai 2001), a porozitása (Gauthier és mtsai 1998) és a specifikus felszínének nagysága (Kasten és mtsai 2005). Az anyag szennyezettsége esetén aszeptikus gyulladásos folyamatok léphetnek fel, melyek a csontpótló anyag lebontásának kontrollálhatatlan felgyorsulásához vezethetnek (van der Meulen és mtsai 1994).

Amennyiben 100-250  $\mu\text{m}$  méretű partikulumokból álló csontpótló anyagot használunk, fokozott csontképződést figyelhetünk meg, de ez a partikulumméret jelentősen csökkenti a primer stabilitást a terhelést viselő defektus területén (Mankani és mtsai 2001). Több tanulmány szerint is az ideális pórusméret 300-500  $\mu\text{m}$ , mellyel a legjobb a csontosodás (Gauthier és mtsai 1998), az ideális specifikus felszín pedig 80  $\text{m}^2/\text{g}$  (Bohner 2000).

A legtöbb eddig klinikai gyakorlatban is használt, főleg tömörítéssel, zömítéssel készített csontpótló anyag specifikus felülete ennél sokkal alacsonyabb:  $0,5 \text{ m}^2/\text{g}$ . Ilyen alacsony specifikus felületű a korábban már említett, klinikai gyakorlatban is használt  $\beta$ -TCP. Csak nemrég fogalmazódott meg az igény fiziológias adottságokkal rendelkező, nem tömörített anyagok fejlesztésére, melyek nagyobb specifikus felülettel rendelkeznek. Ezek közé tartozik a CDHA kerámia is, mely  $48 \text{ m}^2/\text{g}$  specifikus felülettel rendelkezik (Bohner 2000).

Jelenleg főleg kalciumfoszfát kerámiákat alkalmaznak a klinikai gyakorlatban (Cornell és mtsai 1991). Egyértelmű tendencia azonban manapság az olyan felszívódó kerámiák kifejlesztése, amelyek vezető vázként segítik elő a csontképződést. A kerámiák felszívódásával párhuzamosan nő bele az új csont, mintegy helyettesítve azt.

## 1.8 Kalciumfoszfát kerámiák

A kalciumfoszfátok felhasználásának lehetőségeit a csontpótlásban közel 80 éve kutatják. 1979-ben Ferraro vizsgálta a kalciumfoszfát port, mint csontpótló anyag esetleges felhasználásának lehetőségét. A leggyakrabban használt kalciumfoszfát kerámiák a hidroxipatit (HA) és a trikalciumfoszfát (TCP), melyeket egyaránt használunk defektuskitöltésre és implantátumok felületének bevonására. Ezek az anyagok elérhetőek por, granulátum és blokkosított formában is. Ezek az anyagok intraoperatíván nem képlékenyek és nagy terhelést nem bírnak ki. A kalciumfoszfát kerámiák a szervezetbe jutva nem váltanak ki idegentest típusú reakciót, és a szervezet által jól tolerálhatóak (Finkemeier 2002).

A kalciumfoszfát kerámiák összetételében és struktúrájában bekövetkező kis változások is nagy hatással lehetnek az anyag viselkedésére in vivo körülmények között. Az egyik legfontosabb kérdés adott anyag esetén az oldhatóság kérdése, mely alapján előre lehet jósolni egy adott anyag in vivo körülmények közötti rezorpciós képességét. Ha az adott anyag oldhatósága kisebb, mint a mineralizált csontállományé, akkor az adott anyag csak nagyon lassan, vagy egyáltalán nem bomlik le (Bohner 2000). Fontos további tulajdonsága a kalciumfoszfát kerámiáknak az oszteointegratív tulajdonság, amely azt jelenti, hogy egy anyag és a csont között közvetlen, erős kötés alakul ki. A kerámia és a csont közötti zónában a szabad kalcium és foszfát ionokból kis

hidroxiapatit kristályok rakódnak le. Ezek a lerakódó kristályok teszik lehetővé a csont és a kerámia közötti összeköttetést. Ez a kialakuló kötés fontos abban, hogy az implantátum mobilitása csökkenjen, és a kialakuló stabilitás elősegíti a teljes csontos gyógyulást.

Általában a klasszikus, csontpótló anyagként felhasznált kalciumfoszfátok úgynevezett magas hőmérsékleten előállított kalciumfoszfátok, mint például a  $\beta$ -trikalciumfoszfát ( $\beta$ -TCP), a hidroxiapatit (HA), vagy ezek kompozitja (Bohner 2000). A hidroxiapatit (HA) képlete egy igen komplex formula a  $(\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x})$ , ahol a kalcium és a foszfát arány 1,5 és 1,67 között tud változni. (Bohner 2000).

A biokompatibilis  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$  hidroxiapatit, mint például a Pro Osteon (Interpore Cross, USA) vagy Pyrost (Stryker Howmedica, USA) olyan kristályos kalciumfoszfát, mely a legstabilabban viselkedik vizes oldatban. Ennek az anyagnak a specifikus felülete körülbelül  $1 \text{ m}^2/\text{g}$  (Bohner 2001) és mivel közel tízéves időszak alatt bomlik csak le, ezért gyakorlatilag nem felszívódónak tartjuk.

A kalciumfoszfát cementet (CPZ) 1980-ban Brown és Chow fejlesztette ki (Bohner 2001). Ez az egy- vagy többféle kalciumfoszfát porból és vízből áll. Ha a komponenseket összekeverjük, akkor egy folyékony, injektálható, csontdefektusok alakjára formálható pasztát kapunk, ami pár percen belül megkeményedik. Fő hátránya a makropórusok hiánya, így a lebomlása csak nagyon lassan megy végbe. További hátránya, hogy csak bonyolult szinterizációs eljárás végén lehet előállítani kalciumfoszfát kerámiából.

Azonban egy új eljárás kifejlesztésével Dr. h. c. Robert Mathys Foundationnak sikerült előállítani kalciumfoszfát blokkokat szobahőmérsékleten, megfelelő porozitással, pórusnagysággal, és pórusok közötti összeköttetéssel. Ezeket az anyagokat alacsony hőmérsékletű kalciumfoszfátoknak nevezzük. Ennek a gyártási folyamatnak a lényege, hogy egy hidrofób folyadékot (paraffinolaj), kalciumfoszfát cementpasztát és egy emulgeálószerrel összekeverünk. A keverék megkeményedése után a cementben szétoszlott olajcseppeket kimossuk és az így visszamaradt kalciumfoszfát blokk porózus struktúrával rendelkezik. A cementpép, az olaj és az emulgeáló szer arányának változtatásával a porozitás, a pórusok mérete és így az adott kerámia specifikus felülete változtatható (Bohner 2001).



Azokat a kalciumfoszfátokat, melyeket magas hőmérsékleten, úgynevezett szinterezési eljárással állítunk elő legtöbbször 1000°C-nál is magasabb hőmérsékleten, magas hőmérsékletű kalciumfoszfátoknak hívjuk. Ezek struktúrájukban, kémiai összetételükben és oldhatóságukban is különböznek az úgynevezett alacsonyhőmérsékletű kalciumfoszfátoktól. Ennek megfelelően az in vivo lebomlási képességük esetén is joggal számítunk jelentős eltérésre magas hőmérsékletű kalciumfoszfátokhoz képest (Bohner 2001).

### **1.9 A kalciumdeficiens hidroxiapatit (CDHA) kerámiák tulajdonságai és felhasználási lehetőségei**

A kicsapódott hidroxiapatitot, melyben a kalcium és a foszfáttartalom aránya másfél, kalciumdeficiens hidroxiapatitnak (CDHA) nevezzük  $(\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5(\text{OH}))$ . A kémia összetétele nagyon hasonlít a  $\beta$ -TCP-jéhez, de teljesen más a kristályszerkezete. A CDHA egy nem tömörített csontpótló anyag. Mint minden alacsonyhőmérsékletű kalciumfoszfát, nagy specifikus felülettel rendelkezik, mely tulajdonságnak köszönhetően biológiailag sokkal aktívabb, mint a hagyományos kalciumfoszfátok. A nagy specifikus felülete igen hasonlónak teszi ebből a szempontból a csont apatitjához. A legnagyobb különbség a különböző ionszennyeződések hiánya, mint például a karbonát- és magnéziumionok. A hidroxiapatitok oldékonysága növekszik a kalcium és foszfát arányának csökkenésével, de függ a pórusok és kristályszemcsék méretétől is. A kristályszemcsék mérete 10-20 nm, ami döntő módon befolyásolja az oldhatóságot. A CDHA oldhatósága nagyjából megfelel  $\beta$ -TCP oldhatóságának. Mind a kettő jó biológiai felszívódóképességet mutat. Nagy specifikus felületének köszönhetően nagy mennyiségű sejtes elemet és növekedési faktort tud megkötni. Elérhető kisebb méretű granulátum formájában, de gyártható belőle nagyobb blokk is (Bohner 2001), emulziós eljárással kalciumfoszfát cementpasztából. Ha a CDHA-t 700°C fok fölé hevítjük, akkor tiszta  $\beta$ -TCP, vagy  $\beta$ -TCP és HA keveréke, vagy tiszta HA (kalciumfoszfát aránya 1,67) jön létre (Bohner 2000). Ebben a munkában elsőként teszteljük in vivo állatkísérletben a CDHA kerámiát. Munkacsoportunk előzetes, in vitro eredményei biztatóak voltak a mezenchimális

össejtek CDHA kerámiákhoz történő adhézióját és oszteogén differenciációját illetően (Kasten és mtsai 2003).

### 1.10 Csontpótló anyagok története, időrendi áttekintése

A csontátültetés, a csontpótlás, a csontpótló anyagok már régóta közkedvelt témái sok kísérletes és klinikai vizsgálatnak. Az első csontátültetésről 1668-ban számolt be egy holland sebész, Job van Meekeren (de Boer 1988). Egy kutya koponyájából származó csontgraft segítségével tudta egy katona traumás koponyacsont-defektusát rekonstruálni. 1820-ban Németországban végezte az első autológ csontátültetést Philips von Walter sebész. A koponyacsonton trepanáció után keletkezett csontdefektust rekonstruálta a beteg saját csontjával. Az első allogén transzplantátumot 1880-ban William Macewen skót sebész használta, de közismertté ez a metódus csak 1915 után vált, amikor F.H. Albee a csonttranszplantációról összegyűjtött eredményeit publikálta. A sérültek nagy száma miatt az Első Világháborúban igen nagy számban lett volna szükség csontpótló kezelésekre. Külön kiemelendő Lindemann és Klapp háborús sebészek munkássága, akik nevéhez a különböző sebészeti eljárások kifejlesztése mellett a rekonstruktív sebészet megszületése köthető. A Második Világháborúban előszeretettel használt xenogén, szarvasmarha eredetű transzplantátumokkal elért rossz eredmények miatt a háború után ezen állati eredetű, xenogén transzplantátumok jelentősen visszaszorultak az emberi csontdefektusok pótlásában. Miután a fogadó szervezetek immunológiai reakcióját az idegen csontok ellen jobban megismerték, lehetett ezen reakciókat csökkentő eljárásokat meghonosítani, mint például a besugárzást és a liofilizálást (Soost 1996).

Már régóta vannak próbálkozások arra, hogy csontdefektusokat különböző csontpótló anyagokkal rekonstruáljunk. A csontpótló anyagok a biológiailag aktív anyagok közé tartoznak (biomaterials), melyek definíció szerint olyan nem emberi szervezetből származó anyagok, melyek az emberi szervezetbe ültetve ott szerkezeti elemeket, szöveteket és ezek által bizonyos funkciókat tudnak pótolni (Rueger 1998). A legrégebbi ezen irányú régészeti lelet a neolitikus korból származó kalapált aranylemez, mellyel egy inka előljáró frontális koponyacsont-defektusát próbálták pótolni (Soost 1996). Sporadikusan előforduló hasonló próbálkozásokról vannak beszámolók. A

csontpótlásnak a középkor után vannak csak pontosan követhető, megbízható, írásos emlékei. 1860 tájákról, amikor az aszeptikus sebészeti eljárások kezdtek elterjedni, egyre több csontpótló anyag felhasználásáról számolnak be. Ezek az anyagok főleg fémek és fémötvözetek voltak. A tizenkilencedik század végéről származnak az első beszámolók, kerámiák, például a hagyományos gipsz, mint csontpótló anyag felhasználásáról (Slatter 1993). Csontdefektus pótlására a kalciumszulfátot 1892-ben Dressman használta. Graves (1972) és Hench (1980) különféle kerámiákat fejlesztettek kalcium tartalmú vegyületekből. Osborn 1978 óta foglalkozik hidroxipatit kerámiákkal (Soost 1996).

Ezidáig a piacon nincs olyan anyag, melynek meggyőző oszteoinduktív hatása lenne, összehasonlítva például az autológ transzplantátumok biológiai aktivitásával és megbízhatóságával. Ezért több szerző ezen implantátumok biologizálását tartja fontosnak, mely ezen implantátumok sejtekkel való benépesítését vagy autológ csonttal való összekeverését jelenti (Rueger 1998).

Csontpótló anyagokra egyre nagyobb igény van, ezért a jövőben egyre fontosabb lesz a már ismert anyagok alaposabb vizsgálata és új anyagok fejlesztése. Különböző indikációknak megfelelően ezek az anyagok növekedési faktorokkal, őssejtekkel és gyógyszerekkel lesznek kombinálhatóak és felhasználhatóak.

### **1.11 Mezenchimális őssejtek**

Minden szöveti regeneráció előfeltétele olyan sejtek jelenléte, melyek szövetet tudnak képezni. Ezért van döntő szerepe az őssejteknek a csontképzéssel foglalkozó szövetmérnökségben.

Őssejtek alatt olyan differenciálatlan sejteket értünk, melyek képesek a replikáció során saját sejtvonalatukat fenntartani, de képesek különböző irányba differenciálódva különböző szövetféleségeket is létrehozni. Megkülönböztetünk embrionális őssejteket (ESC), melyeket blasztocisztákból nyerhetünk, és felnőtt őssejteket, melyeket posztnatalis élőlények szöveteiből izolálhatunk (Fortier 2005). Habár az embrionális őssejtek felhasználásában totipotenciájuk és kvázi halhatatlanságuk miatt nagy lehetőségek rejlenek, felhasználásuk az etikai kérdések mellett számos más nehézségbe is ütközik. Nehéz őket izolálni és tenyészteni, a tenyésztés során gyakran korán és spontán differenciálódnak, az irányított

differentiálódás pedig igen komplikált és nehezen szabályozható kívülről (Heng és mtsai 2004). A felnőtt őssejteket ezzel szemben könnyű izolálni, nagy expansziós potenciállal rendelkeznek stabil fenotípus mellett, egyszerűen lefagyaszthatóak és szállíthatóak, klinikailag sokoldalúan felhasználhatóak (Le Blanc és mtsai 2005). Az őssejteket a progenitor sejtektől az önmegújuló képesség különbözteti meg (Weissmann 2000) aszimmetrikus sejtosztódási képességüknek köszönhetően. A progenitor sejtek őssejtekből képződnek, rendelkeznek differenciációs potenciállal és nagy proliferációs kapacitásuk van, de saját maguk megújítására már nem képesek.

A felnőtt őssejteket kezdetben a nagy osztódási rátájú szövetekből izolálták (Cancedda és mtsai 2003). Az intenzíven kutatott és megismert hemopoetikus őssejtek a csontvelőben szoros szomszédságban vannak az úgynevezett stromális csontvelősejtekkel (bone marrow stromal cells - BMSCs), melyek a hemopoetikus őssejteket funkcionálisan és strukturálisan védő csontvelői stróma egy részét termelik (Mimeault és mtsai 2006). 1966-ban és 1968-ban két különböző munkában publikálta Friedenstein először BMSC sejtek izolálását csontvelőszuszpenzióból (Friedenstein és mtsai 1968, Friedenstein és mtsai 1966). Ezek az adherens, fibroblaszt szerű sejtek in vivo körülmények között oszteoblaszt, kondrocita és adipocita irányba tudtak differenciálódni. Ez a megfigyelés alátámasztotta azt a feltételezést, hogy ezek a sejtek őssejtek, vagy pontosabban, hogy ez a sejtpopuláció tartalmaz őssejteket. Egy adott környezet hatására tehát bármilyen mezenchimális szövet képzésére alkalmasak.

Számos állatfaj csontvelőjéből sikerült ez idáig BMSC sejteket izolálni, mint például az egér (Kuznetsov és mtsai 1989), a patkány (Goshima és mtsai 1991), a nyúl (Friedenstein és mtsai 1968), a kutya (Volk és mtsai 2005), a macska (Martin és mtsai 2002), a disznó (Nakamura és mtsai 2007), a kecske (Kruyt és mtsai 2007), a bárány (Petite és mtsai 2000) és az ember (Haynesworth és mtsai 1992). Embernél a csípőlapátból aspirációval nyert pár ml csontvelő általában elegendő egy primer sejt kultúra indításához (Petite és mtsai 2002).

Mezenchimális őssejtek izolálásához első lépésben a csontvelő mononukleáris sejteit válogatjuk sűrűség-grádiens felhasználásával. Később azt a tulajdonságukat kihasználva tudjuk végleg kiválogatni az MSC sejteket a különböző sejtenyészti médiumok segítségével, hogy képesek a sejtenyészti edények műanyagjához kötődni, letapadni (Krebsbach és mtsai 1997). Manapság szinte kizárólag ezt, a műanyaghoz

való letapadás képességét kihasználó módszert alkalmazzuk az MSC sejtek izolálásában (Pittenger és mtsai 1999). Később az így izolált sejtpopulációk tovább vizsgálhatóak a rájuk jellemző felszíni antigén- és expressziósprofil, illetve a különböző irányokba való differenciációs képesség alapján. Fontos megjegyezni, hogy a rendelkezésre álló különböző izolációs és tenyésztési protokoll alapján nyert őssejtek egymástól jelentősen különbözhetnek.

A mononukleáris csontvelői sejtek közül csak minden százezredik, milliomodik igazi őssejt (Pittenger 1999). Érdekes, hogy ez a szám az életkor folyamán folyamatosan változik. A születés után például minden tízezredik stromális csontvelői sejt egy igazi MSC, de nyolcvanéves korra már csak minden milliomodik sejt őssejt.

Számos tanulmány bizonyította, hogy egyetlen MSC-ből származó monoklonális sejtenyészet sejtjei egyaránt képesek oszteogén, kondrogén és adipogén irányba differenciálódni (Pittenger és mtsai 1999). Szintén bizonyított az izomsejtek irányába történő differenciáció képesség is (Awad és mtsai 1999). Más munkacsoportok leírták annak a lehetőségét, hogy speciális in vitro és in vivo körülmények között részben funkcióképes endotelsejtek (Aranguren és mtsai 2007), idegszerű sejtek, hepatociták, és a hemopoetikus rendszer sejtjei differenciálódjanak MSC-ből (Jiang és mtsai 2002).

Ismert továbbá, hogy az MSC sejtek többszöri passage után is megtartják proliferációs aktivitásukat és differenciációs képességüket. És habár az öregedés során folyamatosan csökken a számuk, mindig találunk elegendő mennyiséget sejtenyészet indításához, és így egy esetleges sejterápiához. Megfigyelték, hogy MSC sejtek in vitro körülmények között harmincszoros populációmegkettőződés után is megőrizték oszteogén irányba történő differenciációs képességüket (Haynesworth és mtsai 1992).

MSC sejtekre egyelőre hiányzik specifikus marker, akkor is ha bizonyos markerek szinte mindig jelen vannak. (Lakshmiathy és mtsai 2005). Ezek közé a markerek közé tartoznak például a CD 34-, CD 38-, CD 44+, CD 45-, anti-HLADR-, anti-HLA-A-, B-, C-, CD 80-, CD 66-, CD 13+, CD 29+, CD 73+, CD 90+, CD 105+/-, CD 106-, CD 166+. Évekkel ezelőtt aktívan vizsgálták a STRO-1 felületi antigén szerepét MSC-ék identifikálásában, szerepe azonban máig ellentmondásos (Dennis és mtsai 2002).

Napjainkban a mezenchimális őssejtek készen állnak a sejtalapú kezelési stratégiák és eljárások részeként humán- és állatgyógyászati felhasználásra. Kíthó és

munkatársai (2004) disztrakciós oszteogenezis során használták fel klinikai gyakorlatukban. Igazolni tudták, hogy minimálinvazív módon az oszteotómiás részbe juttatott MSC-k felgyorsították a gyógyulást és szignifikánsan fokozták a csontregenerációt (Kitoh és mtsai 2004). Sokat ígérő eredményekről tudósítottak Horwitz és munkatársai oszteogenezis imperfektás betegek töréskezelése során alkalmazott MSC terápiás hatásáról is (Horwitz és mtsai 2002). Számos állatkísérletben sikerült új, későbbiekben esetlegesen humán terápiás felhasználási lehetőséget is magában rejtő eljárásokat kifejleszteni. Mangi és munkatársai sikeresen használtak MSC-t patkány szívinfarktus után kialakult szívizomkárosodás mérséklésére (Mangi és mtsai 2003). Számos kutatás bizonyította, hogy a mezenchimális őssejtek különböző csontpótló anyagokkal közösen felhasználva gyorsítják a csontgyógyulást, és a szegmentális csontdefektusok csontos átépüléséhez vezetnek. Kraus és munkatársai egy porózus hidroxipatit  $\beta$ -TCP mátrixra vittek fel kutyákban mezenchimális őssejteket, és ezzel egy 21 mm-es szegmentális femurdefektust töltöttek ki. Az üresen hagyott csontdefektusok területén atrófiás álízület alakult ki, míg az őssejtekkel kombinált  $\beta$ -TCP csoportban kielégítő csontos átépülést figyeltek meg. Az őssejtekkel kezelt mátrixok pórusaiban szignifikánsan több új csont képződött, mint az őssejtekkel nem kezelt mátrix pórusaiban. Azt is megfigyelték, hogy az őssejtekkel nem kezelt mátrixok pórusaiban főleg fibrózus szövet alakult ki (Kraus és mtsai 2006). Petite és munkatársai bárány 25 mm-es szegmentális metatarsus defektusát töltötték ki korallal. A korallok egy részét üresen hagyták, egy részét frissen pungált csontvelővel vonták be, és egy részére előzetesen izolált és tenyésztett MSC-vel vonták be. A defektusok egy részét kitöltetlenül hagyták. Teljes csontos átépülést csak az MSC-vel kitöltött csoport egy részében figyeltek meg (Petite és mtsai 2000). Brehmen egy vizsgálat során 120 ló esetén autológ őssejtinjekció pozitív hatásáról számolt be felületes hajlítói defektusok gyógyítása során (Brehm 2007). Oyama és munkatársai egészséges kutyák szkeletális izomzatából izolált és expandált mioblasztokat juttatott arteria femoralis katéter segítségével a kutyák koronáriájába. Sikerült igazolniuk a bejuttatott sejtek túlélését és növekedését a kamrai miokardiális izomzatban. Ez az eljárás ígéretes modellje lehet a dilatatív kardiomiopátia kezelésének, mivel a transzplantált sejtek a miokardiumban funkcióképes szívizomsejteké tudnak differenciálódni, és ezáltal elő tudják segíteni a szív regenerációját (Oyama és mtsai 2005).

## 1.12 Sejttenyésztő médiumok

A standard mezenchimális őssejtek tenyésztésére alkalmas médiumok 20% magzati borjúsérumot (FCS) tartalmaznak (Haynesworth és mtsai 1992; Kuznetsov és mtsai 2000, Petite és mtsai 2002).

Az FCS tartalmazza a sejtek adhéziójához, proliferációjához és differenciációjához szükséges faktorokat (Petite és mtsai 2002). Klinikai felhasználás szempontjából az FCS-t tartalmazó tenyésztőfolyadékkal szaporított sejtek problematikusak lehetnek, mert a sejtek felszínén a szarvasmarhából származó fehérjék megtapadhatnak, és a sejtek belsejébe is bekerülhetnek. Már alacsonyabb FCS koncentráció (2% FCS) mellett is kimutatták a sejtek kontaminációját szarvasmarhából származó fehérjékkel. Kérdéses azonban, hogy ezen szennyeződés elkerülése érdekében az FCS mentes tenyésztőfolyadékban kezelt sejtek milyen tulajdonságokkal rendelkeznek, és hogyan használhatóak fel. Johnson és munkatársai kimutatták, hogy azok a keratinociták, melyeket 5%-os FCS tartalmú folyadékban tenyésztettek, egy három és nyolc napos FCS mentes mediumban való tartózkodás után is tartalmazták a kezdeti, szarvasmarha eredetű fehérjék 31 százalékát. Kimutatták azt is, hogy ha csökkentik a tenyésztőfolyadékok FCS tartalmát, akkor sem csökken szignifikánsan a sejtek által felvett szarvasmarha eredetű fehérje mennyisége (Gregory és mtsai 2006).

Kimutatták továbbá, hogy az FCS már igen kis mennyiségben is erősen immunogén ágensként viselkedik rágcsálókban és emberben is (Gregory és mtsai 2006). Felmerül szarvasmarhák szivacsos agyvelő-gyulladásának (BSE) terjedéséért felelős prionok átvitelének lehetősége is az FCS tartalmú tenyésztőmédiumok felhasználásának esetén (Brown 2005). Fennáll a lehetősége egyéb korokozók emberre történő átvitelének is, melyet elősegít az a tény, hogy a szövetépítés (Tissue Engineering) keretén belül főleg jó vérellátású helyre juttatunk FCS oldatban tenyésztett sejtes elemeket. További hátránya az FCS-nek, hogy a különböző forrásból származó oldatok jelentős különbséget mutatnak, és így jelentős mértékben befolyásolják a sejtosztódás mértékét. Így elengedhetlenné válik felhasználás előtt egy in vitro kísérletekhez kötött kalibrációs vizsgálatok sor (Lennon és mtsai 1996).

Több munkacsoport is dolgozik FCS mentes tenyésztőoldatok kifejlesztésén, melyekkel sikeresen lehetne MSC-t tenyészteni. Ilyen próbálkozások a szérumentes

tenyésztőoldatok, az autogén vagy allogén szérumot tartalmazó oldatok vagy a szintetikus szérumanalógokat tartalmazó oldatok. A szérummentes médiumok a kimaradó MSC kolóniaképződés miatt nem alkalmasak sejtszaporításra (Kuznetsov és mtsai 2000). Müller és munkatársai szingenikus egérszérumot használtak, melynek hatására a sejtek proliferációja jelentősen csökkent (Müller és mtsai 2000). Lennon és munkatársai által kifejlesztett expansziós médium a xenogén szarvasmarha szérum, amely FCS helyett albumint (BSA) tartalmaz. Ebben a tenyésztőoldatban a sejtek proliferációs rátája megegyezett az FCS-t tartalmazó médiumokban tenyésztett sejtekével (Lennon és mtsai 1996). A Gronthos és Simmons által bevezetett szérummentes médium tartalmaz szarvasmarha pankreasból származó inzulint. Az eredményes sejtenyésztéshez szükséges volt a tenyésztőedények falát fibronektinnel bevonni és a médiumba EGF-et (Epidermal Growth Factor) és PDGF-et (Platelet-derived Growth Factor) tenni (Gronthos és mtsai 1995). Autológ szérum használatával az FCS-sel azonos eredmény érhető el az MSC sejtek izolálása és tenyésztése terén (Stute és mtsai 2004), de nagyobb sejtszám esetén már nehezen előállítható mennyiségre van szükség, és így ennek rutinszerű használata nem praktikus. Az allogén, egyesített szérum sem jelent alternatívát, mert felhasználása az MSC-k növekedésének gátlását, a sejtek halálát okozza (Sotiropoulou és mtsai 2006) és továbbra is fennáll különböző betegségek átvitelének lehetősége. Kuznetsov és munkatársai humán szérum felhasználása után csökkent sejtproliferációról és csökkent oszteogén differenciációs képességről számoltak be MSC-k in vitro és in vivo tenyésztése során (Kuznetsov és mtsai 2000). Vannak szintetikus szérumanalógok (Nuserum), melyekkel igen jó eredményeket értek el sejtek tenyésztése során (Wong és mtsai 1993), de megfizethetetlenül drágák. További hátrányuk, hogy pontos összetételük nem ismert, így esetlegesen xenogén anyagokat is tartalmazhatnak. Összefoglalva tehát az FCS tartalmú médiumok egyelőre nélkülözhetetlenek a mezenchimális sejtek izolálása és tenyésztése során.

### **1.13 Trombocitában gazdag plazma**

A trombocitában gazdag plazma (PRP) nem más, mint egy trombocita-koncentrátum, melyet két centrifugálási lépésben vérből lehet előállítani (Yamada és



mtsai 2004, Weibrich és mtsai 2003). Az így előállított PRP körülbelül hatszor annyi trombocitát tartalmaz ( $1.500.000/\mu\text{l}$ ), ( $260.000/\mu\text{l}$ ) mint a normál vér (Weibrich és mtsai 2003; Weibrich és mtsai 2004).

A PRP egy sor növekedési faktort tartalmaz magas koncentrációban, mint például a PDGF (Platelet-derived Growth Factor), a FGF (Fibroblast Growth Factor), az IGF (Insulinlike Growth Factor), a TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$ ), az EGF (Epidermal Growth Factor) és a VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (Weibrich és mtsai 2003; Weibrich és mtsai 2004). Ezek a fent említett növekedési faktorok döntő szerepet játszanak a csontgyógyulás korai fázisában. A PDGF-nek döntő szerepe van a sebgyógyulás szabályozásában, a sejtprolifерáció, az angiogenezis és a többi növekedési faktor termelésének fokozása révén (Yu és mtsai 2003). A PDGF elősegíti a csontgyógyulást a mezenchimális őssejtek és az oszteoblasztok kemotaxisának és proliferációjának serkentésével (Gruber és mtsai 2004). A TGF- $\beta$  csoportba általános növekedési és differenciációs folyamatokat szabályozó faktorok tartoznak, melyek a csontregenerációs folyamatokban az oszteoklaszt képződést és a csontfelszívódást gátolják (Gosain és mtsai 2000). Ezen túlmenően a TGF- $\beta$  stimulálja a mezenchimális őssejtek proliferációját (Lieberman és mtsai 2002). Úgy tűnik továbbá, hogy a TGF- $\beta$  hatása függ a sejtek érettségi fokától is. Egy tanulmány szerint humán oszteoblaszt sejtkultúrához korán adva gátolta a mineralizált mátrix kialakulását (Puelo és mtsai 2003). Az IGF-1-ről ismert, hogy az oszteoblasztok számát emeli, így serkenti a csontgyógyulást. Emelkedett koncentrációja kimutatható patkányok és emberek gyógyuló töréseinek területén. Az IGF-1 pontos hatása mezenchimális őssejtekre nem ismert (Jadlowiec és mtsai 2003). Az EGF a mezenchimális őssejtek proliferációját és migrációját szabályozza. A VEGF az endotelsejtekre fejt ki hatást, és így indukálja a neovaszkuarizációt. Az FGF-2 fontos szerepet játszik a csontnövekedés és csontátépülés szabályozásában az oszteoblasztok és az oszteoklasztok közötti finom egyensúly beállítása révén. Ismert továbbá angiogenezist serkentő hatása is. Az FGF-2-nek döntő szerepe van a mezenchimális őssejtek mitotikus aktivitásának szabályozásában (Lieberman és mtsai 2002).

Ismert a trombocyták mikrobaölő képessége. A trombocyták degranulációja során szabadulnak fel a bennük lévő növekedési faktorok (Landesberg és mtsai 2000). A degranulációs folyamat trombin és kalcium hozzáadásával kiváltható, de előidézhető

a PRP minta mélyfagyasztásával és gyors felolvasztásával is (Zimmermann és mtsai 2003). Weibrich és Gruber kimutatták, hogy a PRP fokozza az oszteoblaszt szerű sejtek proliferációját (Gruber és mtsai 2004; Weibrich és mtsai 2003). A PRP szintén fokozza a mezenchimális őssejtek proliferációját (Lucarelli és mtsai 2003, Weibrich és mtsai 2003, Gruber és mtsai 2004). Marx és munkatársai használták a PRP-t elsőként a klinikumban. Egy klinikai tanulmányban igazolták, melybe 44 beteget vontak be, hogy a PRP-vel összekevert autológ spongiózával kezelt mandibularis csontdefektusok szignifikánsan gyorsabban gyógyultak és a csontsűrűség is nagyobb lett, mint a csak autológ spongiózával kezelt betegcsoportban (Marx és mtsai 1998). Ezen kívül számos szájsebészeti tanulmány foglalkozik a PRP csontgyógyulásra kifejtett hatásával. A PRP felhasználhatóságát főleg implantátumok csontos rögzítésének elősegítése céljából vizsgálják. Zechner és munkatársai kisméretű malacokon végzett kísérletsorozatban kimutatták, hogy dentális implantátumok környezetében fokozott csontképződés figyelhető meg PRP felhasználása után (Zechner és mtsai 2003). Patkány tibiájába ültetett kisméretű titánimplantátumok környezetében PRP alkalmazása után szignifikánsan több csont képződését tudták megfigyelni, mint PRP alkalmazása nélkül (Fontana és mtsai 2004). Patkányban, kritikus méretű femurdefektust kialakítva Rai és munkatársai azt találták, hogy ha a defektus kitöltésére használt polikaprolakton-trikálciumfoszfát (PCL-TCP) kerámiához PRP-t adnak, akkor az fokozza az angioneogenezist és a csontgyógyulást (Rai és mtsai 2007).

Vannak azonban munkacsoportok, amelyek a PRP csontgyógyulásra, biodegradábilis anyagok felszívódására és implantátumok rögzülésére gyakorolt semmilyen pozitív hatását nem tudták kimutatni. Sőt olyan publikációk is vannak, melyek kimondottan negatív hatásról számolnak be a PRP felhasználása után. Immundeficiens egerek esetén megfigyelték például, hogy PRP hatására csökken az ektópiás csontképződés az intramuszkulárisan elhelyezett demineralizált csontmátrix felszínén (Ranly és mtsai 2007). Ezeken kívül bizonyíték van arra, hogy a PRP előállítás módja, és az elért trombocitakonzentráció befolyásolja a PRP hatékonyságát. Az ideális, csontképződést legjobban serkentő trombocitakonzentráció  $1 \times 10^6$  mikroliterenként. Ennél alacsonyabb koncentráció esetén a hatás csökkenhet, míg nagyobb koncentráció esetén kifejezett gátlóhatás érvényesül (Weibrich és mtsai 2004). Ennek valószínű oka az afiziológiás növekedési faktorkonzentráció okozta gátló illetve

citotoxikus hatás. Már korábban is ismert volt az egyik legfontosabb trombocitából származó növekedési faktor, a TGF- $\beta$  koncentrációfüggő antimitogén hatása (Pollard és mtsai 2001). Általánosságban, in vitro sejtkultúrák esetén is megfigyelhető ez a koncentrációtól függő hatás, a trombocita tartalmú sejtenyésző folyadékok esetén. A koncentráció emelésével addig nő a sejtek proliferációs rátája, amíg egy platót el nem ér. A koncentráció további emelése pedig már inkább gátló hatást fejt ki (Weibrich és mtsai 2003).

PRP-t speciális eljárásokkal kis mennyiségben könnyen elő lehet állítani, mint például a Curasan cég PRP-kitje (Kleinostheim, Németország) (Weibrich és mtsai 2003). Gruber és munkatársai kimutatták, hogy a trombin aktivált trombociták felülúszója MSC sejtek migrációját és proliferációját fokozza, mialatt in vitro az oszteogén differenciációt gátolta. A PDGF volt a proliferáció fokozásáért felelős, mert a PDGF-et neutralizáló antitestek hozzáadása csökkentette a sejtproliferációt (Gruber és mtsai 2004).

A PRP-ről közölt eddigi in vitro és in vivo körülmények között nyert adatok ellentmondásosak, így ezek tisztázásához újabb, megbízható forrásból származó vizsgálatok eredményei szükségesek.

#### **1.14 Mátrixok sejttel való bevonása**

A csontpótló anyagokra felvitt fibronectin vagy laminin elősegíti a mezenchimális őssejtek megtapadását és oszteogén irányú differenciációját (Dennis és mtsai 1992). Az ilyen bevonási folyamatok célja, hogy úgy módosítsuk az adott anyag felszínét, hogy az a MSC-k számára kedvezőbb legyen. A fent említett két anyag nagyon drága, így intenzív kutatások folynak esetleges helyettesítésükről. Humán szérum esetlegesen olcsó és jó alternatíva lehet, mert egyszerűen és nagy mennyiségben előállítható. Ha autológ szérumot használunk, akkor egy esetleges infekció átvitelével nem kell számolnunk és immunreakciók sem alakulnak ki.

### 1.15 Csontpótló anyagok vizsgálatához alkalmas állatmodellek áttekintése

Különös figyelmet kell fordítani mindig az adott állatfaj kiválasztására és a lokalizációra. Döntő fontosságú minden emberre vonatkozó kérdésfeltevést tartalmazó állatkísérlet esetén az eredmények emberre való alkalmazhatósága. A legfontosabb szempont tehát állatmodell kiválasztása esetén, hogy az eredmények jól alkalmazhatóak legyenek emberre is.

Tipikusan hosszú csöves csontok úgynevezett kritikus méretű diafizéális csontdefektusait (critical-size-defects) használjuk különböző csontpótló biokerámiák vizsgálatához (Geiger és mtsai 2005, Geiger és mtsai 2007). Kritikus méretűnek nevezünk egy csontdefektust, ha a defektus az adott állat vagy ember annak teljes élettartama alatt sem gyógyul meg. Ez hosszú csöves csontok esetén általában a csont hosszának 10 százalékát meghaladó defektusméretnél alakul ki. Megfigyelték azt is, hogy ha csontdefektus mértéke a csontátmérőnél nagyobb, akkor a szervezet saját regenerációs mechanizmusai már nem tudják a defektust ismételten felépíteni, és álízület jön létre. Egy kritikus méretű csontdefektus esetén a defektus területén nem csont, hanem haszontalan fibrózus szövet képződik, mely miatt a csont formáját és funkcióját is elveszíti. Tuli és Gupta 1981-ben dolgoztak ki egy álízületek vizsgálatához alkalmas állatmodellt. Ebben a modellben úgy hozták létre a kritikus méretű csontdefektust, hogy felnőtt nyulak proximális ulnájából egy 1-1,5 centiméteres csontszegmentumot eltávolítottak. A defektusok 6 hét alatt sem gyógyultak meg, egyedül a radius irányából volt megfigyelhető kisméretű csontképződés (Tuli és mtsai 1981).

Bouxsein és munkatársai ennek a modellnek a módosított változatát használták a növekedési faktornak számító Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) vizsgálatához. Ez volt az első felhasználása a 2 centiméteres, kritikus méretű, nyúl radius diafizisén létrehozott modellnek (Bouxsein és mtsai 2001). Geiger és munkatársa a VEGF növekedési faktor csontgyógyulásra kifejtett hatását egy a radius diafizisén kialakított másfél centiméteres kritikus méretű csontdefektuson vizsgálták, melyet felnőtt, új-zélandi fehér nyulakon (NZWR) alakítottak ki (Geiger és mtsai 2007).

## 1.16 Az óriássejtes csonttumor

### 1.16.1 Bevezetés

A csontok primer tumorai ritkák, az összes daganatos megbetegedéseknek kb. 0,5-1 százalékát alkotják. Viszonylagos ritkaságukat mutatja, hogy pl. a leggyakoribb rosszindulatú csontdaganat, az oszteoszarkóma esetén az éves új megbetegedések száma 1,5/1 millió lakos, ami Magyarországon évi 15-20 új megbetegedést jelent (Dahlin 1978).

Az elmúlt évtizedek intenzív kutatásai a csontdaganatok újabb felosztásához vezettek. A csonttumorokon belül jelenleg külön kategóriaként szerepelnek az úgynevezett intermedier dignitású csonttumorok. Ezeknél a tumorfajtáknál a hagyományos szövettani vizsgálattal lehetetlen következtetni a betegség várható kimenetelére, a daganatok biológiai viselkedésére (Szendrői és mtsai 1989). Az óriássejtes csonttumorok esetében például jelenleg csupán statisztikai valószínűséget alapul véve mondhatjuk, hogy a daganatok kb. 90 százaléka benignusan viselkedik, 3-5 százalékuk primeren malignus formában jelentkezik, 5 százalékuk malignusan transzformálódik, illetve kb. 1-5 százalékuk a jóindulatú szöveti kép mellett tüdőáttéteket adhat (Renard és mtsai 1994). E tumor biológiai viselkedése szélsőségek között ingadozik: a lassan progrediáló, az akár egyetlen kikaparással véglegesen gyógyítható alaktól egészen a minden radikális sebészi próbálkozás, kemo- és radioterápia ellenére feltartóztathatatlanul progrediáló, tüdőáttéteket adó, sőt némelykor multifokális, gyorsan halálhoz vezető formáig (DeSmedt és mtsai 1999).

### 1.16.2 Történeti áttekintés, klasszifikáció, epidemiológiai adatok

A csontok óriássejtes tumora az ortopédiai onkológia folyamatosan jelentkező, több évtizede aktuális problémái közé tartozik. A primer csonttumorok 4-5 százalékát alkotja (Renard és mtsai 1994, Enneking 1983).

Az óriássejtes csonttumor agresszív daganat, melynek szövete jól vaszkularizált. Orsó alakú, vagy ovális mononukleáris sejtekből, valamint számos oszteoklaszt típusú óriássejtből áll (Hüvös 1979). A tumort korábban oszteoklasztómának hívták, ma inkább a

csontok óriássejtes tumora megnevezést használjuk, utalva arra, hogy nem a daganat szöveti képeire jellegzetes oszteoklaszt típusú óriássejtek a tumorparenchyma meghatározó proliferatív elemei. Ezek az óriássejtek, amelyek akár 100 maggal is rendelkezhetnek, megjelenésüket, viselkedésüket illetően megfelelnek a csont oszteoklasztjainak. Elfogadott vélemény szerint ezek az oszteoklaszt típusú óriássejtek, a mononukleáris macrofág sejtek fúziója által jönnek létre. A daganatra jellemző viselkedésért a csontvelő mezenchimális őssejtjeiből származó sejtvonaltól felelős (Unni 1996).

Az a tény, miszerint e tumor kifejezetten hajlamos a kiújulásra – nemcsak a csontos kiindulási helyén, hanem a környező lágyrészekben is, esetenként úgynevezett benignus tüdőáttéteket adhat, sőt kifejezetten malignusan is viselkedhet –, ellentmondó megítélések talaját képezte a daganat természetét, benignus, ill. agresszív voltát illetően (Eckardt és mtsai 1986).

Osztályozási rendszert dolgozott ki Campanacci (Campanacci és mtsai 1987) és Enneking is (Enneking 1996), ahol az elkülönítés a radiológiai megjelenés, illetve szövettani grading alapján történik. A Campanacci féle radiológiai megjelenés szerint megállapított fokozatok (Grade 1, 2, 3,) összhangban állnak az Enneking szerinti 1, 2, 3 sebészi stádiumokkal. Az egyetlen különbség a két klasszifikáció között, hogy Campanacci az általa Grade 3-nak besorolt óriássejtes csonttumort már malignus szarkómának tartja, mely többnyire egy konvencionális, benignus óriássejtes csonttumor irradiációját követően alakul ki. Enneking a Grade 3-as tumort, noha az már stromális atípiát mutat, és kiújulási hajlama fokozottabb, még nem tartja malignusnak, hanem a benignus tumorok csoportjába sorolja. Jelenleg is e két rendszer képezi a benignus csonttumorsztádiumbeosztásának alapját. A Campanacci-Enneking beosztás leginkább e tumorok gyakorlati megítélése, a kezelés megtervezése szempontjából hasznos, de nem utal a betegség prognózisára, mivel a tumorok az egyes stádiumokból átmehetnek a következő stádiumokba.

Fenti beosztást alapul véve az egyes stádiumba tartoznak az úgynevezett látens óriássejtes csonttumorsztádiumok (10-15 százalék), melyek radiológiai megjelenésére jellemző a csont éles szélű, körülírt, sima szegélyű litikus léziója, mely teljes terjedelmében intraosseálisan helyezkedik el, a környező kortikális állományt legfeljebb vékonyítja, de panaszokat nem okoz. Felismerése többnyire véletlenszerű. A második stádiumba tartozik az óriássejtes csonttumorsztádiumok túlnyomó többsége, mintegy 70-80 százalékuk. Ezen aktív

formák még mindig intraosseálisan helyezkednek el, de radiológiailag már kevésbé jól körülírtak, a szubkondrális régióba törnek, a csontot a környező lágyrészek felé elődomborítják. Panaszokat okoz, a beteg az érintett területen fájdalmat érez, esetleg duzzanatot tapint. A hármassztađiumba az óriássejtes csonttumrok 5-15 százaléka sorolható. Ezek a lokálisan agresszív tumorok a csont előboltosításával, vagy anélkül már áttörnek a kortikálisra, betérjednek a környező lágyrészekbe. Kifejezettebb a tumor recidíva kézsége is ebben a stádiumban (Szendrői és mtsai 1989).

Az óriássejtes csonttumor, előfordulását illetően mindkét nemet közel egyenlő arányban érinti (Hüvös 1979, Enneking 1983). A betegek életkorát illetően a tumorok 70-80 százaléka a 20-40 éves kor között fordul elő, azonban szórványosan idösebb korban, illetve 5-6 százalékos gyakorisággal szkeletálisan még éretlen fiatal betegeknel is jelentkezhethet. Ez utóbbi esetekben főként a tibiából indul ki a folyamat, csonton belül többnyire a metafízisre lokalizált. Különös problémát jelent ilyenkor az óriássejtes csonttumornak a leggyakoribb, ugyancsak fiatal korban jelentkező malignus csonttumortól, az oszteoszarkómától történő elkülönítése.

### **1.16.3 Klinikai tünetek, klinikopatológiai vonatkozások**

Klinikai tüneteit illetően az óriássejtes csonttumor észlelését megelőzően néhány hetes, ritkábban néhány hónapos fájdalom vezet be, melyhez később csatlakozik az érintett terület fokozatosan növekvő, meleg tapintatú duzzanata, mely malignus csonttumor gyanúját is keltheti (Szendrői és mtsai 1989). A közeli ízületben mozgáskorlátozottság alakulhat ki. Csigolyatestre lokalizált esetben kompressziós törés jelenhet meg, következményes radikuláris tünetekkel, az epidurális kiterjedéstől függően akár paraplégiával is (Eckardt és mtsai 1986). A térd körüli lokalizációnál, főleg a disztális femurvégben gyakran okoz patológias törést.

Az óriássejtes csonttumor tipikusan monosztotikus megjelenésű, mely elsősorban a hosszú csontok végében alakul ki, leginkább a femur disztális, a tibia proximális, a radius disztális, a humerus proximális végét érinti (Enneking 1983, Szendrői és mtsai 1989). Az eseteknek csaknem felében a térd környékéről indul ki (Unni 1996). A gerincen főleg a csigolyatesteket érinti (Eckardt és mtsai 1986), leggyakrabban a sacrum az elsődleges kiindulási hely, a lumboszakrális átmenet felett viszont már kivételesen ritka (Gruber és

mtsai 1999). Fiatalabb életkorú betegek esetén észlelték az óriássejtes csonttumor kézen történő előfordulását is (Yin és mtsai 1995). Ritkán, de a lapos csontokban (scapula, sternum, patella) is kialakulhat (Bay és mtsai 1999).

Létezik a monosztotikus óriássejtes csonttumorkok mellett ennek a tumornak a multicentrikus, poliosztotikus formája is. Igen ritka, főként a nagyobb esetszámot bemutató közlemények említik, gyakoriságát 1 százalék körül megadva (Dahlin 1985). Az irodalomban eddig 43 körüli az ismertetett esetek száma (Cummins és mtsai 1996). A multifokális kialakulásának mechanizmusa nem ismert. A kézen, ill. lábon előforduló óriássejtes csonttumorkoknál fokozottabb mind a poliosztotikus manifesztáció, mind pedig a tüdőáttétek kialakulásának kockázata (Eckardt és mtsai 1986). Ezeknél radikálisabb sebészeti megoldás ajánlott, a tumor széles, en-bloc rezekciója (Szendrői és mtsai 2000).

#### **1.16.4 Radiológiai jellemzés**

Radiológiai megjelenését illetően az óriássejtes csonttumor egyenmő, litikus csontdestrukciót okoz. Általában jellemző, hogy excentrikus, kerek vagy ovális az elváltozás. A kortikálist elvékonyítja, perioszteális reakció nem kíséri. A környező csontszövet felé rendszerint jól elhatárolódik, azonban szklerotikus szegélye nincsen. Epifizeális lokalizációja folytán előszeretettel terjed az ízületi felszín szubkondrális régiójába, amelynek következményeként az ízületi felszín terhelésre beroppanhatnak (Szendrői és mtsai 1989). Röntgen képe alapján mindennek előtt az oszteolitikus oszteosarkómától, a myelomától, a carcinoma metasztázistól, az aneurizmás csontcisztától, a kondroblasztómától és a barna tumortól kell elkülöníteni (Szendrői és mtsai 1989).

Az óriássejtes csonttumort hipervaszkuarizáció, intenzív, nem teljesen homogén kontrasztanyag felvétel, korai vénás telődés, és esetenként a patológiás érrajzolat jellemzi. Angiográfiás megjelenése alapján nem különíthető el egyértelműen más, malignus csonttumortól. T1-súlyozott MR képeken tipikusan alacsony és közepes jelintenzitást mutat, míg T2-súlyozott MR képeken közepes és magas jelintenzitás jellemző rá. Hemosziderin lerakódás szintén alacsony jelintenzitást eredményez. Dinamikus felvételeken gadolinium kontrasztanyag adását követően gyorsan progrediáló halmozást lehet megfigyelni, mely folyamatot egy gyors kimosódás követ (Verstraete és mtsai 2000).



### 1.16.5 Patológia

Makroszkóposan az óriássejtes csonttumor meglehetősen jellegzetes képet mutat. Az epi- és metafízisben jelenlévő, gyakorta a szubkondrális régióig terjedő üreget vérbő, hemosiderin lerakódástól sárgásbarna, gyakran bevérzett, laza, esetenként mállékony tumorszövet tölti ki. A tumor állományát kötőszövetes sővények is tagolhatják, melyek meszet tartalmazhatnak. Az óriássejtes tumorban is képződhet szekunder aneurizmás csontciszta. Ilyen esetekben a vérrel telt üregek annyira uralhatják a képet, hogy a valódi tumorszövet csupán a csontos üreg szélét alkotó vékony sávra szűkül. A gyakori kortikális destrukció ellenére a lágyrészekbe terjedő óriássejtes csonttumort keskeny, újonnan képződött vékony csonthéj határolhatja. Oka, kialakulási mechanizmusa nem tisztázott, feltehetően az óriássejtes csonttumor oszteoinduktív hatásáról van szó (Dahlin 1985).

Az óriássejtes csonttumor mikroszkópos morfológiájára a sokszínű megjelenés jellemző. Az óriássejtes csonttumorkok alapvetően két sejttípusból állnak. A mononukleáris stromasejtekből, melyek tovább oszthatók a CD68 és CD163 pozitív, valószínűsíthetően reaktív, monocitamakrofág vonalhoz tartozó histiocita és a CD68 negatív, feltételezhetően neoplasztikus sejtpopulációra, ezek sejtenyészetben proliferálnak, és inkább oszteoblasztos fenotípust mutatnak. A csontdestrukció óriássejtes csonttumorban a többmagvú oszteoklaszt típusú óriássejtek által mediált. Ezen oszteoklasztok csontvelői eredetű, keringő, monocita/makrofág fenotípust mutató prekursorokból alakulnak ki, valamint azon makrofág előalakokból, melyek magának a tumornak a mononukleáris komponensét is képezik. A RANKL (receptor activator for nuclear factor  $\kappa$  B ligand) és a M-CSF (macrophage colony stimulating factor) a két fő oszteoklaszt képződésért felelős faktor. A mikrokörnyezeti hipoxia szintén hozzájárul az oszteoklasztogenezishez a HIF (hypoxia-inducible factor) expresszió indukciója és a következményes VEGF szekréció stimulálása révén oszteoblasztokban és oszteoklasztokban. A mononukleáris orsó jellegű sejtek kulcsszerepet játszanak a preoszteoklasztok kemotaxisában és az intratumorális oszteoklaszt képződésben. Képesek mind keringő, mind intratumorális mononukleáris oszteoklaszt prekursor sejtekből oszteoklaszt-képzést indukálni szolubilis RANKL termelő képességük révén, valamint különböző extracelluláris mátrix komponensek bontásához is hozzájárulnak gelatináz és kollagenáz termelésükkel (Knowles és mtsai 2008).

A szövettani kép aszerint változik, hogy az állományban mekkora a bevérzés, az ödéma, mennyi a hegszövet, esetenként a reaktív csontképződés. Változatos megjelenést adhat a hemosziderin lerakódása, a tumorban fellépő nekrozis (Campanacci és mtsai 1987), a sejtek alakja (orsószerű illetve kerek sejtek), a sejtek, a magok nagysága, a kromatin mennyisége, a mitózisok száma, a többmagvú oszteoklaszt típusú óriássejtek mennyisége, illetve megoszlása, a kollagéntartalom, és a vaszkularitás (Eckardt és mtsai 1986, Szendrői és mtsai 1989). A tumorsejtek körül gazdag retikulinrost-hálózat van, másutt nagyobb területen fibrózis és xanthomasejtek csoportjai láthatók. E változatos megjelenésű tumornál a szövettani, morfológiai kritériumok alapján történő csoportokba sorolással, ill. ez utóbbiaknak a tumor agresszivitásával történő szembeállításával már Jaffe és munkatársai is próbálkoztak, azonban összefüggést nem sikerült megállapítaniuk (Jaffe és mtsai 1940). Később is történtek ilyen jellegű próbálkozások, de a szövettani besorolás továbbra sem bizonyult megfelelő eszközhöz a tumor agresszivitásának, biológiai viselkedésének, recidívakészségének becslésére (Campanacci és mtsai 1987, Unni 1996).

A molekuláris patológia lehetőségeinek bővülése, a citogenetikai vizsgálati módszerek fejlődése, új távlatokat nyitott a csonttumorok kutatásában. Felfedezték egyebek között, hogy a tumorsejtek a genetikai instabilitás jeleként számos kromoszómális eltéréssel rendelkezhetnek, mely utóbbiak gyakorisága a tumor malignitásával összefüggést mutathat. Az oszteoklasztómákra általában nem jellemző valamely speciális kromoszóma eltérés a telomerikus asszociációk (TAS) vagy telomerikus fúziók kivételével, melyekről az esetek 85%-ában számolnak be (Sciot és mtsai 2000). Az eddig leírt TAS által leggyakrabban érintett telomerek a 11p, 15p, 19q, 21p, 18p, 13p és 20q. A telomerfúziók és visszatérő telomerikus eltérések nagy száma óriássejtes csonttumorokban azt a feltételezést támasztja alá, hogy ezen telomerikus események nem csupán mellékleletet jelentenek, hanem köztes lépésként szolgálnának vagy prekursor eltérések lennének további strukturális aberrációk felé. A hTERT (human telomerase reverse transcriptase) expressziója ugyan valóban tetten érhető oszteoklasztómákban, nem korrelál azonban sem a telomer hosszal, sem a TAS gyakoriságával, mely az előbbi elméletet cáfolni látszik (Forsyth és mtsai 2008). Szintén leírták a passzálások számával együtt emelkedő TAS gyakoriságot óriássejtes csonttumorban, mely arra utal, hogy a TAS-pozitív sejteknek in vitro szelektív előnyük van (Forsyth és mtsai 2008). A teljes DNS

tartalom meghatározást illetően részben ellentmondásos adatok jelentek meg a prognózist illetve a benignitás-malignitás kérdését illetően (Sakkers és mtsai 1997, Sági és mtsai 2002).

Az onkogének, ill. tumor-szuppresszor gének szerepének kutatása a csonttumoroknál, így az óriássejtes csonttumoroknál is folyamatban van. Az IL-6 és az urokináz-típusú plazminogén aktivátor mellett sejtciklus-szabályozó fehérjéről (p53, p27, cyclin D1) és onkogénekről (c-myc) szintén leírták, hogy szerepük lehet az óriássejtes csonttumor patogenezésében. A mononukleáris sejtes komponens szeparált vizsgálatát lehetővé tevő DNS kenet-citofotometriának is lehet prognosztikus értéke proliferációs aktivitás meghatározással kombinálva (Sági és mtsai 2002). Az utóbbi években vizsgálják az óriássejtes csonttumorok extracelluláris állományát is. Úgy tűnik, az extracelluláris állomány metalloproteináz enzimrendszerének döntő szerepe van a csontállomány lebomlásában, e tumorok vaszkuláris inváziójában (Ueda és mtsai 1996).

Különös képessége az óriássejtes csonttumoroknak, hogy esetenként tüdőáttétet képezhetnek. Irodalmi adatok szerint, noha az óriássejtes tumorok 84-86%-a benignus (Campanacci és mtsai 1987, Eckardt és mtsai 1986, Szendrői és mtsai 1989), egy részükben a környező érlumenekben tumor-embolusok láthatók. Ez a jelenség magyarázatot adhat arra, hogy a szövettanilag benignus óriássejtes tumorok néhány százalékban a tüdőben áttétek alakulnak ki, melyek szöveti képe a primer tumoréval teljesen megegyezik (Katz és mtsai 1987). Ismertté vált, hogy még a grade 1. óriássejtes csonttumorok is adhatnak tüdőáttétet (Szendrői és mtsai 1989). Az óriássejtes csonttumornál a pulmonális metasztázisok kialakulását, illetve azok viselkedését illetően a konvencionális szövettani és radiológiai vizsgálatok nem nyújtanak támpontot.

Ismert tény, hogy az óriássejtes csonttumorok 10-15 százaléka malignus daganatként viselkedik (Campanacci és mtsai 1987, Eckardt és mtsai 1986, Szendrői és mtsai 1989). E csoporton belül is megkülönböztetünk primer és szekunder malignus formákat. A ritkább primer malignus forma esetén egy konvencionális óriássejtes csonttumorrall együtt, mintegy arra ráarakódva találjuk helyenként a kifejezetten malignus stromát. A primer malignus forma gyakorisága 2-5 százalék körüli (Eckardt és mtsai 1986). Az óriássejtes csonttumorok malignus transzformációja is ritka, létrejöhet spontán a recidívák során, korábbi, esetleg évtizedekkel előbb végzett korszerűtlen (orthovoltos) radioterápia következtében, illetve más betegség (Morbus Paget) talaján.

A kivizsgálási protokoll legfontosabb láncszeme a szövettani vizsgálat. Az esetek döntő többségében az intraoperatív, fagyasztásos szövettani vizsgálat alapján dönteni tudunk afelől, hogy a kérdéses, klinikai-radiológiai tünetek alapján óriássejtes csonttumorok gyanított csontdaganat valóban az-e.

Az óriássejtes csonttumorok fokozott kiújulási hajlamában számos tényező játszik szerepet. Ide tartozik a daganat széles skálán mozgó, némelykor igen kifejezett agresszivitása, a lézió lokalizációja és kiterjedése, valamint - e két utóbbi tényező következményeként is - a sebészi eltávolítás elégtelen volta (Szendrői és mtsai 1989, 1990). Az óriássejtes csonttumorok kimenetele a fokozott kiújulási hajlam, a gyakran ismételt műtétek ellenére az esetek túlnyomó többségében jó. Ide tartoznak a látens és aktív alakok, de az agresszív formák sem járnak törvényszerűen mindig kiújulással, mint ahogy látens tumorok lokális adjuváns kezeléssel kiegészített ellátását követően is léphet fel recidíva.

Az óriássejtes csonttumorok várható viselkedése a hagyományos szövettani vizsgálatokra, ill. szövettani gradingre támaszkodva nem prognosztizálható. E tekintetben a jelenleg általánosan elfogadott, általunk is alkalmazott, a sebészi kezelés megtervezésére leginkább alkalmazott összevont Campanacci-Enneking szerinti radiológiai-sebészi stádiumbesorolás is jobbára megközelítő információt nyújt (Campanacci és mtsai 1987, Enneking 1983).

#### **1.16.6 Az óriássejtes csonttumor sebészi kezelése**

Az óriássejtes csonttumor kezelése elsődlegesen sebészi. Alapelve, hogy a tumort lehetőleg az épben távolítsuk el, megőrizve nemcsak a végtagot, hanem a környező ízület funkcióját is (Eckardt és mtsai 1986, Szendrői és mtsai 1989). E két, egymásnak ellentmondani látszó követelménynek nehéz megfelelni, főként ha meggondoljuk, hogy az óriássejtes csonttumor döntően epifizeális, ízületközeli elhelyezkedésű. Óriássejtes csonttumorok esetén a sebészi kezelés extenzív kikaparást vagy en-bloc rezekciót jelent, de nagyon ritkán kiterjedt betegség vagy szerencsétlen anatómiai lokalizáció esetén akár amputáció is szükséges lehet. A recidíva arányának csökkentése érdekében próbálkoztak a kikaparás után lokális adjuváns technikák alkalmazásával. Hasznosnak bizonyult a keletkezett üreg fenollal, ill. alkohollal történő öblítése, amely módszer a tumor széli

44

### 1.16.7 Az óriássejtes csonttumor szisztémás kezelése

Nemrégiben elérhetővé vált előrehaladott, korábban csak jelentős funkcióvesztéssel, esetleg amputációval kezelhető illetve nem operálható óriássejtes csonttumoros betegek számára a csontritkulás és a csont metasztatikus daganatainak kezeléséből ismert denosumab nevű gyógyszer. A denosumab egy humán monoklonális antitest, mely gátolja a RANKL-ot. Elsőként az Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hivatala, majd az Európai Gyógyszerügynöksége is regisztrálta előrehaladott óriássejtes csonttumor neoadjuváns kezelésére (Chawla és mstai 2013). A tumor méretének jelentős csökkenése valamint egy meszes gyűrű kialakulása figyelhető meg a tumor, illetve annak lágyrészkomponense körül három-négy hónap kezelés után. Ha a kezelést tovább folytatjuk, akkor jelentős meszesedés jelenik meg a tumor területén is. Denosumab kezelés hatására megfigyelhető a neoplasztikus stromális sejtek részleges oszteoblaszt irányú differenciációja oszteoid mátrix képzésével (Chawla és mtsai 2013). A neoadjuváns denosumab hatására bekövetkező down staging hatására tehát könnyebbé válhat nagy lágyrészkomponenssel rendelkező, nagyméretű tumorok esetén a kikaparás (Chawla és mtsai 2013). Fontos azonban megemlíteni, hogy neoadjuváns denosumab kezelés után végzett intralézionális kikaparás lokális recidívamentes túlélését nem ismerjük. Több szerző feltételezi, hogy a daganat a gyógyszer abbahagyása után visszatér, tekintettel arra, hogy az nem közvetlenül a tumorsejtekre hat, hanem indirekt módon, az oszteoklasztokra hatva fejt ki hatását. Egyes sebészek szerint a neoadjuváns denosumab által csökkentett tumor műtéti ellátása során a gyógyszeres kezelés előtti méret alapján kell megtervezni a műtétet, mert csak így kerülhető el a műtét utáni kiújulás.

Egy nyílt jelölésű fázis kettő vizsgálatban (NCT00396279) az óriássejtes csonttumoros betegek 86 százaléka reagált a denosumab kezelésre, amely szövettani preparátumokon az óriássejtek 90 százalékanak eltűnését vagy a radiológiai progresszió elmaradását jelentette. Egy második, nagyobb esetszámú (282) fázis kettő vizsgálat (NCT00680992) részeredményei is a denosumab magas hatékonyságáról számolnak be (Chawla és mtsai 2013). Nem operálható óriássejtes csonttumorok esetén stabil, nem progrediáló daganatokat figyeltek meg az esetek 96 százalékában denosumab kezelés után. Ugyanezen vizsgálatban részt vevő 222 kikaparással kezelhető beteg esetén pedig a betegek 86 százaléka profitált a kezelésből, 48 százaléknál nem volt szükséges a műtét,

38 százaléknál pedig az eredetileg tervezett műtétnél jóval kisebb műtéti beavatkozás is elegendőnek bizonyult. Fontos azonban hangsúlyozni, hogy ezek nem hivatalos részeredmények, a hosszú távú utánkövetés eredményei még hiányoznak.

A biszfoszfonátok feltételezések szerint a csont ásványi anyag tartalmához kapcsolódnak, gátolják az oszteoklasztok képződését, migrációját és a csontrezorpció helyén oszteolitikus aktivitásukat. Elősegítik továbbá az oszteoklasztok apoptózist is. Kisebb beteganyagok retrospektív feldolgozásával nyert adatok alapján biszfoszfonátok alkalmazásával sikerült lassítani a lokalizált és metasztatikus óriássejtes tumorok növekedését (Yu és mtsai 2013), de egy nem randomizált, prospektív fázis kettes vizsgálatban adjuváns zoledronsav adásával nem sikerült a kúretázs utáni recidívaarányt csökkenteni (Gouin és mtsai 2014). Nem ismerjük továbbá a zoledronsav neoadjuváns adása esetén annak hatékonyságát sem. Bár a denosumab hatásosabbnak tűnik óriássejtes csonttumorok kezelésében, de továbbra sincs összehasonlító tanulmány a biszfoszfonátok és RANKL inhibitorok hatásosságáról (Lau és mtsai 2013).

#### **1.16.8 Az óriássejtes csonttumor radioterápiája**

Ellentmondásos az óriássejtes csonttumor kezelési protokolljában a radioterápia szerepe. Nehezíti a kérdést a denosumab megjelenése és elterjedése is a nehezen vagy egyáltalán nem rezekálható óriássejtes csonttumorok kezelésében. Előfordulhat, hogy a tumor sebészileg nem távolítható el maradéktalanul, ez leginkább a medencére, gerincére lokalizált esetekben fordulhat elő. Ilyenkor egyre inkább a denosumab az első választandó kezelés. Előfordulhat azonban, hogy a gyógyszeres kezelés kontraindikált, hatástalan vagy nem elérhető. Ezekben az igen ritka esetekben egyetlen megmaradó lehetőségként radioterápiát alkalmazunk. A radioterápia műtetre nem alkalmas óriássejtes csonttumorok hatékony kezelési módja lehet, akár 80 százalékos 5 éves recidívamentes túlélést is biztosítva (Ma és mtsai 2015). Ismeretes, hogy egy korábbi irradiációt követően akár évtizedekkel később is bekövetkezhetett a tumor mezenchimális sejtjeinek malignus elfajulása. Ez főként a régen alkalmazott orthovoltos terápiás röntgen készülékek esetén volt reális veszély, a korszerű, nagyenergiájú, megavolt-terápia ezt a veszélyt kiküszöböli (Suit és mtsai 1999). Saját véleményünk szerint, tekintettel a radioterápia általános, nemkívánatos mellékhatásaira, komplikációkra, a minimális, de létező malignizációs

veszélyre, és a reális alternatívát jelentő, új, biológiai kezelések megjelenésére végtagi lokalizáció esetén, sebészileg hozzáférhető esetekben a radioterápia nem indikált. Célszerű azonban alkalmazásának mérlegelése, ha csak inkomplett kikaparás jöhet szóba törzsközei lokalizáció esetén.

#### **1.16.9 A malignus óriássejtes csonttumorok kezelése**

A primer vagy szekunder malignus óriássejtes csonttumorok ellátása elsődlegesen sebészi. Az ilyen esetek ritkasága miatt nincs kellő tapasztalat sem a kemoterápiát, sem pedig a radioterápiát illetően. Megkísérelhetők e kezelések a másodlagos szarkóma szövettani típusa, malignitási foka alapján, de az 5 éves túlélési eredmények így is csupán 50 százalék körül vannak (Anract és mtsai 1998).

Nem egyöntetű az irodalomban az állásfoglalás a metasztázisok kezelését illetően sem. Vannak, akik ismételt rezekciót, masszív kemoterápiát javasolnak (Siebenrock és mtsai 1998), míg mások a benignus óriássejtes csonttumorok alapján kedvező prognózisára való tekintettel a gondos megfigyelést ajánlják, az extenzív lobektómiák, kemo- és radioterápia elkerülésével (Sanjay és mtsai 1998).



## 2. Célkitűzések

Jelenleg a küretázst követő csontcement kitöltés az elfogadott operatív eljárás a teherviselő ízületek közelében elhelyezkedő nagy cisztikus elváltozások esetén, mint az óriássejtes csonttumor, az aneurizmás csontciszta és a kondroblasztoma (Labs és mtsai 2001, Ozaki és mtsai 1997). Teherviselő ízület közelében elhelyezkedő csontdefektusok rekonstrukciójában csontcement felhasználás után a biomechanikai változásokkal összefüggő degeneratív elváltozásokat figyelték meg állatmodellen. Más tanulmányok pedig kiváló eredményekről számoltak be a szubkondrális autogén csontgraftok beültetését követően, mellyel próbálták normál állapotba visszaállítani a szubkondrális csontszerkezetet és biomechanikai funkciót. Számos szerző felvetette, hogy a szubkondrálisan alkalmazott csontcement használata növelheti a később jelentkező szekunder artrózis lehetőségét, azonban ez az állítás bizonyítást még nem nyert (Campanacci és mtsai 1975, Frassica és mtsai 1993, Hisatome és mtsai 2002).

Kritikus méretű csontdefektusokat a klinikai gyakorlatban általában autológ spongioza átültetésével kezelünk. Az autológ csont azonban csak korlátozott mértékben áll rendelkezésre, kinyerése pedig gyakran szövődmények kialakulásához vezet. Lehetőség van allogén csont átültetésére is, ilyen esetben azonban immunreakciók kialakulására lehet számítani, és különböző fertőző betegségek is átvihetőek. Ennek megfelelően intenzív kutatások folynak különböző csontpótló anyagok kifejlesztésére, melyek segítségével a természetes csontot megfelelő módon tudnák pótolni.

Ezek az anyagok, mint például a porózus kerámiák, jó oszteokonduktív tulajdonságokkal rendelkeznek. A csak oszteokonduktív tulajdonsággal rendelkező implantátumok felhasználásának a csont és a kerámia közötti kontaktfelszín limitált mérete szab határt. További hátránya ezen anyagoknak nagy csöves csontokon kialakult defektusok pótlása esetén a hiányzó oszteoinduktivitás. Ezért a kutatások következő lépése ezen anyagok oszteoinduktív tulajdonságának kifejlesztése volt, melyet első körben különféle növekedési faktorok, mint például a BMP hozzáadásával értek el. A növekedési faktorok az újcsont képződésére azonban csak adekvát, kompetens sejtek jelenlétében tudják hatásukat kifejteni. Ezért a kutatások következő szintjén a biokerámiákat oszteogén potenciállal rendelkező sejtekkel kombinálták.

Munkánk első felében ismertetett retrospektív vizsgálatunk célja az volt, hogy megfigyeljük és összehasonlítsuk a szubkondrálisan elhelyezkedő óriássejtes csonttumороk kikaparása után a kialakult üreg kitöltésére használt eltérő sebészeti technikákat, valamint a zömített csontforgács és csontcement hatását az alsó végtagi teherviselő ízületekben kialakuló szekunder degeneratív elváltozásokra.

Tudomásunk szerint csak szórványos ismeretek vannak a trombocitában gazdag plazma esetleges felhasználásának lehetőségeiről a kritikus méretű csontdefektusok gyógyításában. Ezért úgy döntöttünk, hogy munkánk második felében megvizsgáljuk a PRP hatását a kritikus méretű csontdefektus gyógyulására autológ mezenchimális őssejtekkel és a fent említett nagy specifikus felületű CDHA kerámiával kombinálva. Vizsgálatunkhoz egy új-zélandi fehér nőtény nyúl radiusán kialakított kritikus méretű diafizeális csontdefektus-modellt választottunk. A főbb vizsgált paraméterek pedig a csontosodást követő biomechanikai stabilitás, az újonnan képződött csont mennyisége és a beültetett kerámia felszívódásának mértéke voltak, melyeket négy pontos nem destruktív hajlítási vizsgálattal, mikro-CT vizsgálattal és szövettani vizsgálattal határoztunk meg.

### 3. Módszerek

#### 3.1 Beteganyagunk klinikai vizsgálata

A Semmelweis Egyetem Ortopédiai Klinikáján 1970 óta működik a Csonttumor Regiszter. Retrospektív vizsgálatunkba a Semmelweis Egyetem Ortopédiai Klinikáján korábban általunk kezelt, az intézményben működő Csonttumor Regiszterben nyilvántartott, illetve rendszeresen ellenőrzött óriássejtes csonttumoros betegeket vontuk be. 1970 és 2006 között 199 beteg került műtéti ellátásra végtagi lokalizációjú óriássejtes csonttumor miatt. A vizsgálatunkban szubkondrálisan elhelyezkedő, az alsó végtag teherviselő ízületeiben előforduló, a proximális femurt, a disztális femurt, proximális tibiát és a disztális tibiát érintő, szubkondrálisan elhelyezkedő, intralézionális küretázssal kezelt óriássejtes csonttumороkra fókuszáltunk. Szubkondrálisnak tekintettünk egy daganatot, ha az az ízületi porchoz 3 mm-nél közelebb volt. Hogy képet kaphassunk a szekunder artrózis kialakulásának dinamikájáról, a vizsgálatunkba csak olyan beteget vontunk be, akit legalább 50 hónapig tudtunk utánkövetni. A vizsgálatokból kizártuk azokat a betegeket, akiknek lokális recidívája, szepszikus szövődménye vagy intraartikuláris patológiás törése volt.

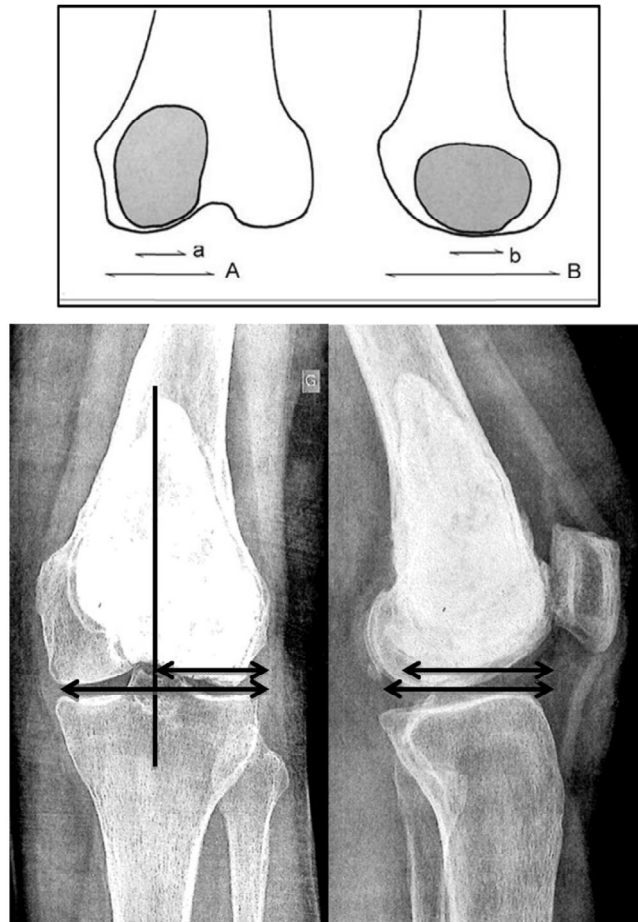
Amennyiben lehetséges volt, a műtét során a vérzés minimalizálásának érdekében vértelenítő mandzsettát használtunk. A csonton mindig kellően nagyméretű ablakot nyitottunk, hogy a teljes üreget megfelelően át tudjuk tekinteni és a daganatszövetet maradéktalanul ki tudjuk kaparni. Alapos kikaparás mellett is a szubkondrális régióra mindig külön figyelmet fordítottunk, hogy ne érje felesleges károsodás. A csontüreget csontcementtel vagy csontbankunkból származó homológ csontforgáccsal töltöttük ki.

Rendelkezésünkre állt a betegek kórtörténete, műtéti leírása, röntgen és esetenként CT felvételei, szövettani metszetei, valamint paraffin blokkba ágyazott műtéti minták. A vizsgálatba bevont betegeinknél elvégeztük a szövettani anyagok revízióját, hogy kizárhassuk azokat, amelyeknél nem biztos az óriássejtes csonttumороk diagnózisa. A hagyományos (hematoxilin-eozin) szövettani metszetek értékelésekor Dahlin kritériuma szerinti beosztást használtunk (Dahlin és mtsai 1985). A recidív és primeren malignus óriássejtes tumороkat vizsgálatunkból szintén kizártuk. A betegek a

nemzetközileg is elfogadott trendnek megfelelő sűrűséggel jártak kontroll vizsgálatra, az első 2 évben 3 havonta, utána 3 évig félévente. A betegeket azonos vizsgálati protokoll szerint követtük: minden alkalommal fizikális vizsgálatot követően 2 irányú konvencionális röntgen képet készítettünk, és képeket összevetettük az előző vizsgálat képeivel. Minden esetben figyeltük továbbá az adott ízületben jelentkező esetleges degeneratív elváltozásokat.

Az óriássejtes csonttumорок stádiumbeosztásánál a Campanacci szerinti radiomorfológiai, valamint az Enneking féle sebészeti kritériumokat összevontan, egymásnak megfeleltetve használtuk, azonban az Enneking szerinti III. stádiumot agresszív, de benignus tumornak tartottuk (Campanacci és mtsai 1975, Enneking 1987). A fentiek alapján 3 stádiumot különböztettünk meg: I. stádium: a defektus körül a csont alakja és kortikálisának vastagsága megtartott, II. stádium: az érintett csont kiszélesedett, a kortikális elvékonyodott, de a tumor nem tört át a környező lágyrészekbe, III. stádium: a tumor a kortikálist áttörte, és a környező lágyrészekbe terjedt.

A szubkondrális csont érintettségéről akkor beszélünk, ha az anteroposterior vagy oldalsó radiológiai felvételeken a tumor és az ízületi porc távolsága kisebb volt, mint 3 mm. A tumor szubkondrális méretének meghatározása Chen és munkatársai által leírt módszert (2. ábra) használtuk (2005).



## 2. ábra

*A szubkondrális régió érintettség területi meghatározásának elve a Chen által kidolgozott módszer (Chen és mtsai 2005) szerint:  $(axb)/(AXB) \times 100 = \text{szubkondrális érintettség százalékosan}$*

A degeneráció mértékének megítélése céljából minden alkalommal az érintett, operált ízületről, és az ellenoldali, egészséges ízületéről kétirányú, álló röntgen felvételt készítettünk. Az ízületi degenerációt Kellgren és Lawrence kritériumai alapján (Kellgren és mtsai 1957) határoztuk meg, kiegészítve az ízületi rés ellenoldali, egészséges ízületi réshez viszonyított esetleges beszűkülésével. A degeneratív elváltozások radiológiai képeinek jeleit két egymástól független értékelő írta le, és akkor tekintettünk egy ízületet artrotikusnak, ha ebben mind a két értékelő egyetértett. Az összehasonlítás a 24 hónapos és az 50 hónapos posztoperatív képekből történt.

Funkcionális értékelést a Muszkuloszkeletális Tumor Társaság (MSTS) 1987-ben elfogadott, majd Enneking irányelvei szerint módosított rendszerrel készítettük

(Enneking 1987). Ez a rendszer hét paramétert vizsgált, úgymint fájdalom, mozgástartomány, ízületi stabilitás, erő, deformitás, általános funkcionalitás és a beavatkozás érzelmi elfogadása a beteg számára. A betegek általános egészségügyi állapotának meghatározása a Short Form-36 kérdőív szerint történt, mely egy validált, általános mérési forma. Nyolc egészségügyi szempont alapján próbál képet alkotni, ezek a szempontok a következők: fizikai aktivitás, fizikai problémák okozta korlátok, testi fájdalom, általános egészség, vitalitás, szociális funkciók, érzelmi problémák és mentális egészség (Ware és mtsai 1992). A fenti kérdésekre adott válaszok alapján egy 100 pontos skálán tudjuk a beteg általános egészségügyi állapotát jellemezni.

### 3.2 Kísérleti állatok

Kísérleteinkhez hat-kilenc hónapos korú új-zélandi nőtény nyulakat használtunk, melyek növekedése már lezárult. A nyulak testtömege átlagosan 4,6 kg volt.

A nyulakat külön ketrecben (Ehret, Emmendingen, Németország), szeparáltan tartottuk, standard módon tápláltuk (ssniff rabbit diet; ssniff Spezialdiäten, Soest, Németország) és a kísérlet teljes ideje alatt engedték szabad mozgásukat. A kísérlet teljes ideje alatt  $16\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  hőmérsékletet biztosítottunk. A levegő páratartalma  $55\% \pm 5\%$  volt. 12 órás világos és 12 órás sötét ciklusokat tartottunk. A ketrecek hetente kétszer takarítottuk, a tápot és a vizet naponta pótoltuk a fogyasztásnak megfelelően. Az állatok tömegét hetente egyszer mértük. Az állatok tartásával kapcsolatos minden adatot jegyzőkönyvben vezettünk.

A következő csoportokat hasonlítottuk össze munkánk során: a kritikus méretű defektust CDHA kerámiával, autológ mezenchimális őssejtekkel bevont CDHA kerámiával, PRP-vel bevont CDHA kerámiával és PRP+MSC kombinációjával bevont CDHA kerámiával töltöttük ki. Kontroll csoportként üresen hagyott defektust, és autológ spongiózával kitöltött defektust használtunk, ahol a nyúl csípőlapátjából vettük az autológ csontot. Minden csoportban hat állat volt. Az állatokat a Heidelbergi Ruprecht Karl Egyetem “In the care and use of animals” protokollja szerint tartottuk és kezeltük. Munkánkat a Heidelbergi Ruprecht Karl Egyetem Állatkísérletekkel Foglalkozó Etikai Bizottsága engedélyezte és felügyelte.

### 3.3 A kerámia

A kalcium deficiens hidroxiapatit kerámia cilinderek 15 mm hosszúak és 4 mm átmérőjűek voltak (Robert Mathys Foundation, Bettlach, Svájc), melyeket emulgeációs eljárás segítségével állítottak elő (Bohner 2000). A kerámiákat egyesével, sterilen csomagolták. Összporozitásuk 85 térfogatszázalék volt, 54 térfogatszázalék volt a makropórusok aránya (0,2-0,6 mm) és 31 térfogatszázalék a mikropórusok aránya (<5 µm). Az általunk használt CDHA kerámia specifikus felülete 48 m<sup>2</sup>/g volt (3. ábra).



#### 3. ábra

*CDHA kerámia morfológiai megjelenése: A: CDHA kerámia külső felszíne, B: CDHA kerámia belső felszíne, C: CDHA kerámia pásztázó elektronmikroszkópos képe (1300x) (forrás: Robert Mathys Foundation, Bettlach, Svájc)*

### 3.4 PRP előállítása

A PRP előállításához 17 ml vért vettünk hat darab hat hónapos új-zélandi fehér nyúl fülartériájából. A protokollt Yamada és munkatársai dolgozták ki (Yamada és mtsai 2004). A vért heparin tartalmú csövekben gyűjtöttük. Az átlagos trombocitaszám  $1.9 \times 10^8$  (SD  $0.39 \times 10^8$ )/ml volt. Ezután két centrifugálási lépés következett: először 209 x g sebességgel 16 percig 20 °C-on centrifugáltuk a mintákat, hogy eltávolítsuk a vörösvértesteket, majd 1500 x g sebességgel 12 percig 20 °C-on, hogy kicsapódjanak a vérlemezkék is. A második centrifugálás után a sejtüledéket újra szuszpendáltuk trombocitában szegény plazmában úgy, hogy az átlagos trombocitaszám  $10.05 \times 10^8$ /ml legyen. A hat donor nyulból származó PRP-t ezután összekevertük és felhasználásig -80 °C-on tároltuk. Ennek megfelelően csak allogén, kevert PRP-t használtunk minden esetben.

### **3.5 Mezenchimális eredetű őssejtek izolálása és tenyésztése**

#### **3.5.1 Sejttenyésztés általános feltételei**

A munkát a nyulakból nyert autológ őssejtekkel minden esetben lamináris áramlást biztosító steril fülkében végeztük (Heraeus Hera safe, Typ HS18, Heraeus Instruments, Hanau, Németország). A pipettázáshoz elektromos pipettát (Hirschmann® pipetus®-akku; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Németország) és sterilen csomagolt szerológiai pipettahegyeket (Falkon®; Fa. Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Németország) használtunk. Minden felhasznált anyagot vagy sterilen csomagolva vettünk vagy használat előtt 3 bar nyomáson, 121 +/- 1°C-on 20 percig sterilizáltuk (Tuttnauer 5050EL; Fa. Systec GmbH Laborsystem technik, Wettenberg, Németország) vagy mint például a Verfaillie tenyésztő oldat esetén előállítás után sterilen szűrtük (Bottle Top Filter für Vakuum, Steritop, 33 mm Gewebe, PES Membran; Fa. Fisher Scientific, Nidderau, Németország). A steril fülkét és minden felhasznált gépet, eszközt rendszeresen dezinficiáltuk Bacillollal® (Fa. B. Braun Melsungen, Melsungen, Németország).

Standard tenyésztési körülményeket használtunk: 37 °C-on, 6%-os CO<sub>2</sub>-ban, a tenyésztő mediumot hetente 2-szer cserélve. A tenyésztő flaskák felületének 80–90 %-os lefedettsége esetén a sejteket leoldottuk tripszint tartalmazó etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA) oldattal (Biochrom, Berlin, Németország), és 1:3 arányban ismételten szélesztettük, ezzel 50–60 %-os lefedettséget elérve a tenyésztő lemezekben. A sejteket visszaültetés előtt 2-4 alkalommal passzáltuk, ami 16-19 duplázódásnak felel meg. Az így nyert és tenyésztett sejtek differenciációs potenciálját oszteogén, kondrogén és adipogén irányba egy korábbi in vitro munkánkban bizonyítottuk (Vogel és mtsai 2006), ezért ezen sejtek véleményünk szerint teljesítik a mezenchimális őssejt kritériumait (Reyes és mtsai 2001).

#### **3.5.2 Tenyésztő oldat**

A sejt kultúrákhoz Verfaillie médiumot használtunk, melynek alapját a pH indikátort is tartalmazó Dulbecco's Modified Eagle médium (DMEM, Invitrogen



GmbH, Karlsruhe, Németország), penicillin, streptomycin (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Németország), magzati borjúsérum (Biochrom AG, Berlin, Németország), MCDB 201 médium (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Németország), IST médium (Sigma-Aldrich Chemie GmbH), dexamethason (Sigma-Aldrich Chemie GmbH), aszkorbinsav (Sigma Aldrich Chemie GmbH) és növekedési faktorok, úgy mint hEGF (Strathmann Biotec AG, Hamburg, Németország) és hPDGF (Strathmann Biotec AG) képezték (1. táblázat). A médiumot steril körülmények között, steril fülkében állítottuk össze és 0,22 µm pórusátmérőjű szűrővel szűrtük át. Ezután kisebb részekre osztottuk és -20°C-on tároltuk. Szükség esetén 37°C-os vízfürdőben felolvasztottuk és csak ekkor raktuk bele a növekedési faktorokat és az FCS-t.

### 1. táblázat

Verfaillie médium összetevői

Alapanyagok	Mennyiség 1 literhez	Végleges koncentráció
DMEM	547,5 ml	-
MCDB	400 ml	-
FCS	20 ml	2 %
IST Supplement	20 ml	-
Inzulin	-	10 µg/ml
Transzferrin	-	10 µg/ml
Selenit	-	10 ng/ml
Penicillin, Streptomycin	10 ml	100 IE/ml (Pen) 100 µg/ml (Strep)
Dexamethason	2 ml	0,02 µM
Aszkorbinsav	580 µl	0,1 mM
EGF	1 ml	10 ng/ml
PDGF	1 ml	10 ng/ml

### 3.5.3 Mezenchimális eredetű őssejtek izolálása

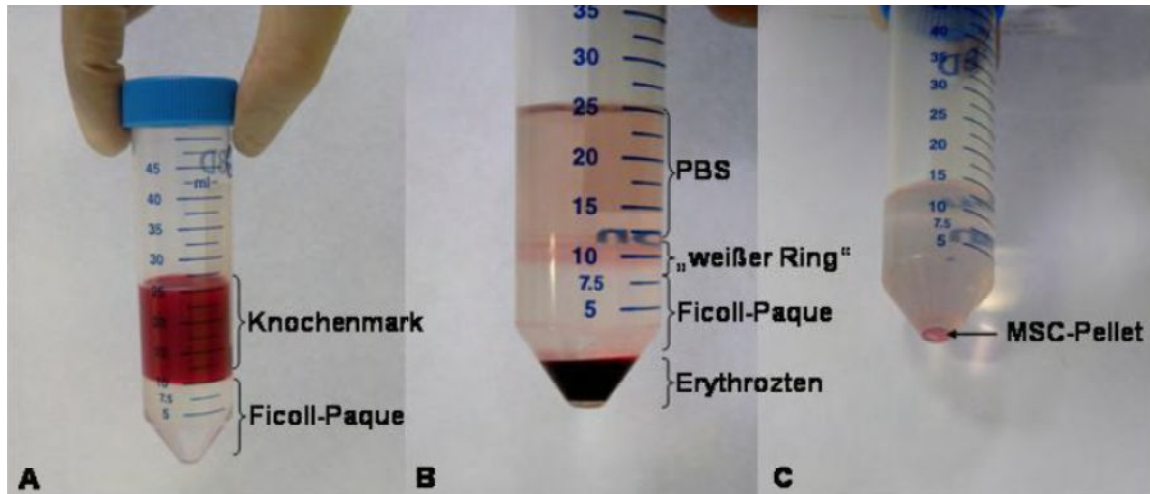
Két héttel a csontdefektus létrehozása előtt minden állattól csontvelőt vettünk. Protokollunk szerint minden állat később a saját, tenyésztett mezenchimális őssejtjeit kapta vissza a CDHA+MSC és a CDHA+MSC+PRP csoportban. A sebészi technika a következő volt: a nyulakat általános anesztéziában operáltuk, melyet izomba adott ketamin-hidroklorid (50 mg/kg BW, Hostaket; Intervet, Karlsruhe, Németország) és xylazine (5 mg/kg BW, Rompun; Bayer Vital, Leverkusen, Németország) segítségével indukáltunk. A műtét előtt minden állat antibiotikum profilaxisban részesült (netilmicin 4 mg/kg BW, Certomycin; Essex Pharma, München, Németország). Minden állat egyik hátsó lábát speciális nyírógép segítségével szőrtelenítettük (Econom Plus; Aesculap, Tuttlingen, Németország), a bőrt szappannal megtisztítottuk (Bouquet; Allgäuer Werkstätten, Sonthofen, Németország), majd végezetül jódos oldattal dezinficiáltuk (Braunol; Braun, Melsungen, Németország). A műtét alatt szemcseppet használtunk (Visidisc; Bausch & Lomb, Berlin, Németország), hogy megakadályozzuk a nyulak szemének kiszáradását.

A proximális tibia felett szikével (Disposable Scalpel No. 10; Feather Safety Razor, Osaka, Japán) egy 2 cm-es metszést vezettünk, és a tibia velőüregét a proximál felől a tibia elülső metafizeális régióját átszúrva megnyitottuk egy 3 mm átmérőjű steril csontvelő-aspirációs tűvel (Yamshidi-Nadel; Walter Veterinär-Instrumente, Rietzneuendorf, Németország). Miután elértük a velőüreget és eltávolítottuk a trokárt, a csontvelőt egy 2 ml-es fecskendővel szívtuk ki (BD Discardi II; Becton Dickinson, Heidelberg, Németország), mely 0,1 ml heparint (B. Braun, Melsungen, Németország) tartalmazott. Az aspirált csontvelőt egy 15 ml-es Falcon csőben (Becton Dickinson, Heidelberg, Németország) 5 ml előemésztő folyadékkal (0,5 ml kollagenáz (Roche Diagnostic Mannheim, Németország) (1,5 mg/ml), 0,5 ml hialuronidáz (Roche Diagnostic Mannheim, Németország) (1 mg/ml) és 4 ml Verfaillie médiummal kevertük össze. A sebet 3-4 bőröltéssel zártuk (PDS II, 4-0; Ethicon, Norderstedt, Németország).

Ezután pipetta segítségével a keveréket homogenizáltuk. A homogenizált keveréket 39 °C-on 8 órán keresztül 35/perces fordulatszámon folyamatosan forgatva (RM 540; CAT, Stauffen, Németország) inkubáltuk. Miután az emésztést 10 ml foszfáttal pufferált sóoldat (PBS; Biochrom, Németország) hozzáadásával leállítottuk,

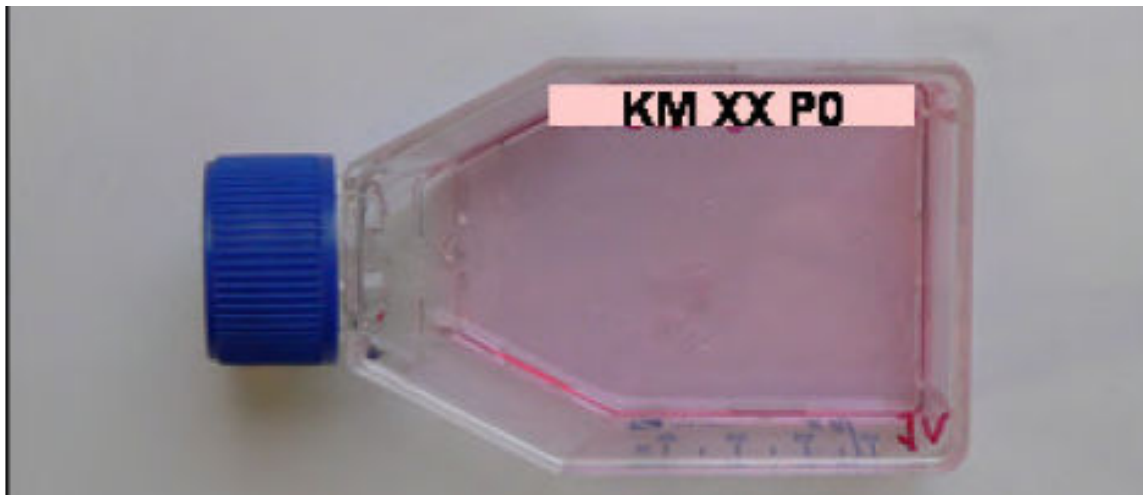
az előemésztett csontvelőt 40 µm-es szűrő (Falcon Cell Stainer, 40 µm Nylon, steril, gamma irradiated, Becton Dickson, Heidelberg, Németország) segítségével átszűrtük. A mintákat ezután PBS (1:2) segítségével mostuk, és kétszer 10 percig 1800/perces fordulatszámon centrifugáltuk (Megafuge 1 OR; Hereaus Instruments) (4. ábra). A felülúszót ismételten eltávolítva megszabadultunk a felesleges zsírtól és vörösvértestektől. Ezután a sejteket megszámoltuk, és 25 négyzetcentiméteres sejtenyésző flaskákban szélesztettük (5. ábra) (Easy Flask filter, Nunclon surface; Nunc A/S, Roskilde, Dánia) 5 ml modifikált Verfaillie tenyésztőfolyadékban (2% magzati borjú szérum (FCS)) (Reyes és mtsai 2001). Huszonnégy óra elteltével a tenyésztőfolyadékot eltávolítottuk és PBS mosást alkalmaztunk, így a nem letapadt sejteket eltávolítottuk. A letapadt sejtek fölé pedig ismételten 5 ml Verfaillie tenyésztőfolyadékot pipettáztunk (6. ábra). Ezek után a tenyésztő médiumot 2 naponta cseréltük (7. ábra).

Amikor a tenyésztőedények alján 70-90 százalékos lefedettség alakult ki, a sejteket átoltottuk. Mint mindig a tenyésztőoldat rutinszerű cseréjénél a kulturmediumot lepipettáztuk és a letapadt sejteket 5 ml steril PBS-sel (Biochrom) átmostuk. 1 ml Tripszin-EDTA (Biochrom) hozzáadása után tenyésztő flaskákat 1 percre inkubátorba tettük, így feloldottuk a tenyésztőtartály aljához letapadva növekedő adherens sejteket. D-MEM 1000 (D-MEM 1000 mg/l Glucose + L-Glutamine + Pyruvate; Invitrogen, Karlsruhe, Németország) oldat hozzáadásával leállítottuk a tripszines emésztést. A sejtszuszpenziót egy Falcon csőbe (Becton Dickinson) áttöltöttük és 1800 rpm fordulatszámon 10 percig centrifugáltuk (Megafuge 1. OR; Hereaus Instruments, Hanau, Németország). A felülúszót eltávolítottuk és a sejteket tartalmazó üledéket 1 ml D-MEM 1000 oldatban (Invitrogen, Karlsruhe, Németország) reszuszpendáltuk. Meghatároztuk az élő sejtek számát. Ezután 2500 sejt /cm<sup>2</sup> sűrűséggel a sejteket tenyésztőedényekben szélesztettük és tenyésztőoldatot adtunk hozzá. A 25 cm<sup>2</sup>-es edényhez 5 ml tenyésztőoldatot, a 75 cm<sup>2</sup>-es edényhez 10 ml tenyésztőoldatot és a 125 cm<sup>2</sup>-es edényhez 15 ml tenyésztőoldatot adtunk. Naponta vizsgáltuk fénymikroszkóp alatt (Axiovert 25; Carl Zeiss Lichtmikroskope, Göttingen, Németország) protokoll szerint a sejtek sűrűségét, morfológiáját, homogenitását és a tenyésztőoldat színét, átlátszóságát.



#### 4. ábra

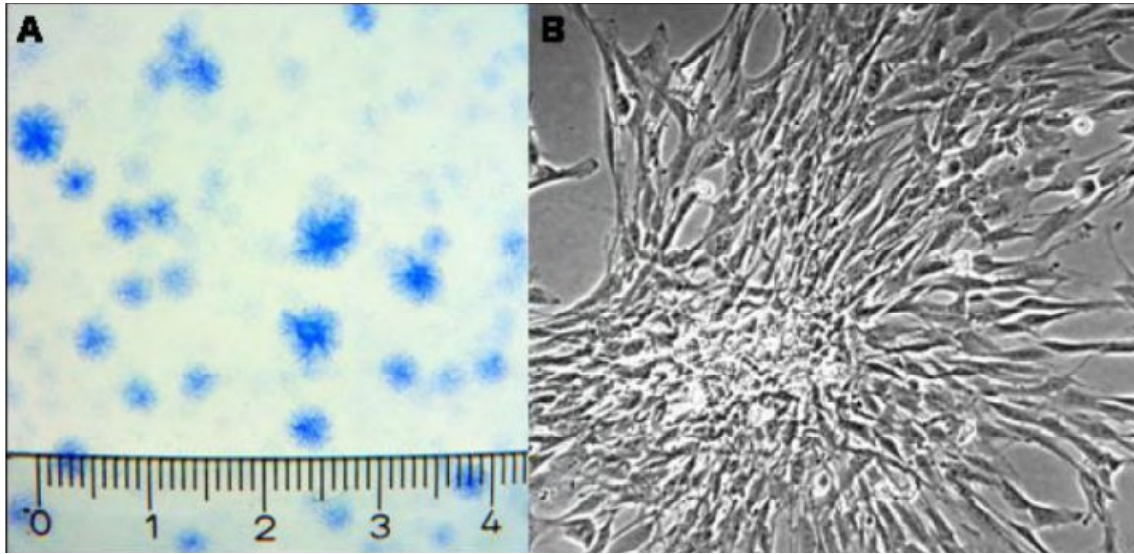
*Az őssejtizolálás különböző stádiumai (forrás: saját fotó)*



#### 5. ábra

*Az őssejtizolálás különböző stádiumai*

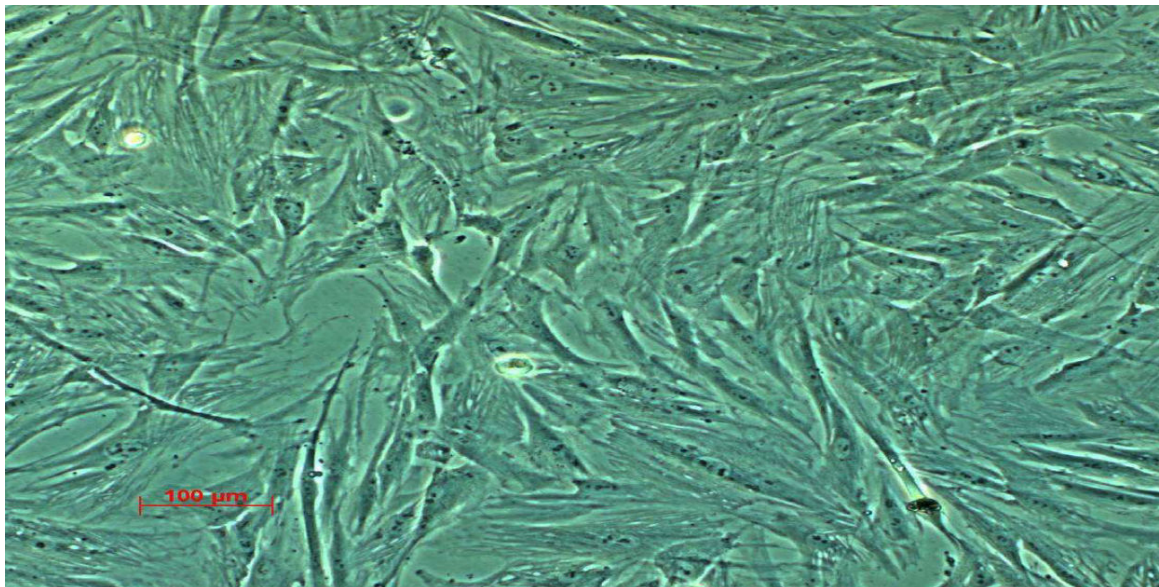
*Sejttenyésztő edény (25 cm<sup>2</sup>) frissen izolált mezenchimális őssejtekkel (forrás: saját fotó)*



**6. ábra**

*A: Mezenchimális őssejtkolóniák izoláció után (passage 0) eredeti méretben,*

*B: Mezenchimális őssejtkolóniák izoláció után (passage 0) százszoros nagyítás mellett  
(forrás: saját fotó)*



**7. ábra**

*Adherens, orsó alakú mezenchimális őssejtek 3 passage után műanyag sejtenyésző edényben (forrás: saját fotó)*

### 3.5.4 Élő sejtek számolása

Az élő sejteket Trypankék festék segítségével számoltuk (Trypan blue Solution 0,4%, Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Németország). A sejtekből centrifugálás után kialakult üledéket 1 ml DMEM 1000-ben (Fa. Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Németország) ismételtelen feloldottuk. Ebből a sejtszuspenzióból 10 µl-t egy Eppendorf csőbe pipettáztunk (Fa. Eppendorf AG, Hamburg, Németország), és 10 µl Trypankék festéket adtunk hozzá. A Trypankék festék rendelkezik azzal a tulajdonsággal, hogy elhalt sejtek felbomlott sejtmembránjába diffundálva kékre festi azt. Ebből az oldatból 10 µl-t pipettáztunk a Neugebauer-féle számlálókamra tárgylemeze alá (Fa. Omnilab Laborzentrum, Bremen, Németország) és mikroszkóp segítségével kiértékeljük (Axiovert 25; Fa. Carl Zeiss Lichtmikroskope, Göttingen, Németország). A számlálókamra négy számlálómezőjében elhelyezkedő élő, nem kék sejteket megszámláltuk. Így ki tudtuk számolni a tenyésztőedényben elhelyezkedő sejtek, és a kiindulási sejtszuspenzióban elhelyezkedő sejtek számát.

### 3.6 Sejtek felvitele a CDHA kerámia felszínére és a PRP használata

Minden kerámiát a beültetés előtti éjszaka 4° C-on 40 µg/ml-es PBS-ben feloldott fibronectin (Sigma-Fibronectin F-2006; Sigma, Taufkirchen, Németország) oldatban inkubáltunk, hogy a sejtek adhézióját elősegítsük a kerámiához, és mert ismert a fibronectin pozitív hatása az új csont képződésére (Vogel és mtsai 2006). Az inkubációt 6 lyukú tárolólemezekben végeztük (Greiner Bio-ONE, Frickenhausen, Németország) steril körülmények között (11. ábra).

A tenyésztő flaskák felszínéről a sejteket tripszinnel leválasztottuk, majd a fentebb ismertetett módon megszámláltuk őket. Ötmillió sejtet reszuszpendáltunk 3 ml Verfaillie tenyésztő folyadékban, és egy 5 ml-es steril csőbe tettük (12,0/75mm; Fa. Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Németország). A fibronectinnel előkezelt kerámiákat belehelyeztük a sejteket tartalmazó 5 ml-es csőbe. Ezeket a kis 5 ml-es csöveket paraffinnal lezártuk és 15 ml steril vizet tartalmazó 50 ml-es Falkon-Tube®-ba raktuk. (Fa. Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Németország). Ezután másfél órán keresztül a kerámiákat és a sejteket tartalmazó csöveket 4° C-on 35 1/min-es

fordulatszámokon forgattuk (CAT RM 5.40; Fa. Fröbel Labortechnik GmbH, Lindau, Németország). Forgatást követően a sejteket tartalmazó kerámiákat egy 6 lyukú steril tárolólemezre raktuk. A maradék sejteket tartalmazó tenyésztő folyadékot kétszer 5 percig 800 x g sebességgel centrifugáltuk, és az így izolált sejteket 70 µl tenyésztő folyadékban a hat lyukas lemezen elhelyezkedő kerámiák felszínére juttattuk.

Előzetes vizsgálataink azt mutatták, hogy az általunk használt sejt felviteli módszer hatékonysága a CDHA kerámiaira 95 %-os. A sejtek nagy része a kerámia felszínétől 1-2 mm-es mélységben helyezkedik el (Kasten és mtsai 2005). A CDHA+PRP és a CDHA+MSC+PRP csoportokban a beültetés előtt közvetlenül először 40 µl frissen felolvasztott PRP-t fecskendeztünk közvetlenül a kerámiákra, majd ezután 10 µl thrombin (0.8 IU aktivitás) és kalcium-klorid (1 M) oldatok keverékét (1:1) (Tissucol-duo; Baxter, Unterschleissheim, Németország). Azoknál az állatoknál, amelyek PRP-t tartalmazó kerámiát kaptak, helyi gyulladásos reakciót és szisztémás immunválaszt, mint például láz, a beültetést követően nem figyeltünk meg.

### 3.7 A műtét

Vizsgálataink során a Wittbjer és munkatársai által kidolgozott állatmodellt használtuk (Wittbjer és mtsai 1982), amikor is egy 15 mm-es unilaterális, kritikus méretű csontdefektust hoztunk létre a nyúl disztális radius diafizisén. A nyulakat általános anesztéziában operáltuk, melyet izomba adott ketamin-hidroklorid (50 mg/kg BW, Hostaket; Intervet, Karlsruhe, Németország) és xylazine (5 mg/kg BW, Rompun; Bayer Vital, Leverkusen, Németország) segítségével indukáltunk. A műtét előtt minden állat antibiotikum profilaxisban részesült (netilmicin 4 mg/kg BW, Certomycin; Essex Pharma, München, Németország). A műtéti területet speciális nyírógép segítségével szőrtelenítettük (Econom Plus; Aesculap, Tuttlingen, Németország), a bőrt szappannal megtisztítottuk (Bouquet; Allgäuer Werkstätten, Sonthofen, Németország), majd végezetül jódos oldattal dezinficiáltuk (8. ábra) (Braunol; Braun, Melsungen, Németország). A műtét alatt szemcseppet használtunk (Visidisc; Bausch & Lomb, Berlin, Németország), hogy megakadályozzuk a nyulak szemének kiszáradását.

Oldalfekvésben operáltunk steril izolálás után. A csontot mediálisan, a disztális radius felett vezetett 3 cm-es metszésből, egyszerűhasználatos szikével (Feather Safety

Razor Co., Osaka, Japan) a lágyrészeket átvágva, az izmokat finoman elhúzva tártuk fel (9. ábra). Hohmann retraktorokat (Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen, Németország) helyeztünk az ulna és a radius közé, hogy védjük az ulnát fűrészelés közben. Oszcillációs fűrészsel (GB128 maximum 20000; Fa. Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen, Németország) 15 mm-es segmentális, diafizális darabot vágunk ki a radiusból (10. ábra). A megmaradt csonton a defektustól proximális és disztális irányban is 5-5 mm-es távolságban gondosan kipreparáltuk és eltávolítottuk a csonthártyát. A defektust steril fiziológiás sóoldattal kimostuk és a defektusba press fit módon behelyeztük az adott csoportnak megfelelő kerámiát (12. ábra)(vagy spongiózus csontot vagy szabadon hagytuk). A defektus felett gondosan, csomós öltésekkel zártuk az izmot, a fasciát és a bőrt 4-0-ás felszívódó fonallal (13. ábra)(Ethilon; Ethicon, Norderstedt, Németország). Az oszteotomizált radius belső stabilizálása nem volt szükséges a radius és az ulna közötti kötőszövetes-csontos összeköttetés miatt, mely a defektustól proximális és disztális irányban is stabilizálta a rendszert. Az implantátum press fit behelyezése sem indokolt esetleges stabilizálást. A spongiózus csontot a csípőlapát hátsó részéből nyertük. Azt 2 cm-es metszésből feltártuk, a fascia átvágása után a csípőlapátot megnyitottuk, és a két kortikális lemez közül a spongiózus csontot kikapartuk. A sebet itt is rétegesen, csomós öltések segítségével zártuk. A műtét utáni fájdalomcsillapítás céljából 4 mg/kg-os dózisban carprofent adtunk standardizált módon. A nyulakat sztandardizált módon etettük és itattuk a “In the care and use of animals” szerint. A műtét után 16 héttel a nyulakat elaltattuk hat milliliter intravénásan beadott Narcoren (Phentobarbital; Merial GmbH, Hallbergmoos, Németország) segítségével. Egyszer használatos szike (Feather Safety Razor Co., Osaka, Japan) segítségével a könyökízületben a nyúl mindkét alkarját exartikuláltuk és a lágyrészekről alaposan megtisztítottuk. A felesleges csontot oszcillációs fűrészsel (GB128 maximum 20000; Fa. Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen, Németország) levágtuk. Azonnali mechanikai vizsgálatok után az alkari preparátumokat 70 %-os etanolba helyeztük.





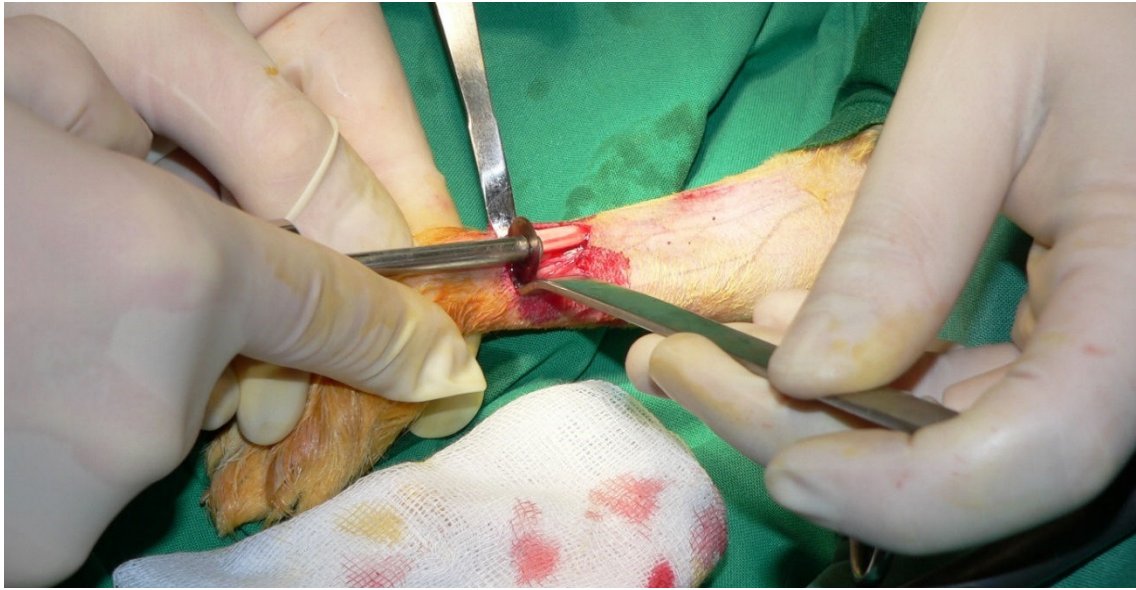
**8. ábra**

*Szőrtelenített, dezinficiált, sterilen izolált nyúl „alkar” (forrás: saját fotó)*



**9. ábra**

*Bőrmetszés után a lágyrészeket feltárva látszik a radius (forrás: saját fotó)*



**10. ábra**

*Oszcillációs fűrészszel 15 mm-es segmentális, diaphysealis darabot vágunk ki a radiusból (forrás: saját fotó)*



**11. ábra**

*Beültetésre váró, összejekkel és PRP-vel bevont CDHA kerámiák steril tárolóedényben (forrás: saját fotó)*





**12. ábra**

*A defektusba press fit módon behelyeztük az adott csoportnak megfelelő kerámiát (vagy spongiózus csontot vagy szabadon hagytuk) (forrás: saját fotó)*



**13. ábra**

*A sebet itt rétegesen, csomós öltésekkel zártuk (forrás: saját fotó)*

### 3.8 Kísérleti terv

A következő csoportokat hasonlítottuk össze munkánk során: a kritikus méretű defektust CDHA kerámiával (3. csoport), autológ mezenchimális őssejtekkel bevont CDHA kerámiával (4. csoport), PRP-vel bevont CDHA kerámiával (5. csoport) és PRP+MSC kombinációjával bevont CDHA kerámiával (6. csoport) töltöttük ki. Kontroll csoportként üresen hagyott defektust (1. csoport), és autológ spongiózával kitöltött defektust (2. csoport) használtunk, ahol a nyúl csípőlapátjából vettük az autológ csontot. Minden csoportban hat állat volt, így kísérleteinkhez összesen 36 állatot használtunk fel. Az állatokat a Heidelbergi Ruprecht Karl Egyetem “In the care and use of animals” protokollja szerint tartottuk és kezeltük. Munkánkat a Heidelbergi Ruprecht Karl Egyetem Állatkísérletekkel Foglalkozó Etikai Bizottsága engedélyezte és felügyelte.

A beültetés után a nyulakat 16 hétig tartottuk, majd leöltük. A beültetés után közvetlenül, majd 4 hetente 2 irányú kontroll röntgent csináltunk, hogy az implantátum helyzetét és az esetleges szövődményes csonttörést észrevegyük. A nyulak leölése után a főbb vizsgált paraméterek a csontosodást követő biomechanikai stabilitás, az újonnan képződött csont mennyisége és a beültetett kerámia felszívódásának mértéke voltak, melyeket négy pontos nem destruktív hajlítósos vizsgálattal, mikro-CT vizsgálattal és szövettani vizsgálattal határoztunk meg.

Az egyes csoportba tartozó hat nyúl radiusán egy másfél centiméteres, üresen hagyott csontdefektust hoztunk létre. Három nyúlnak jobb, háromnak pedig a bal oldalán alakítottuk ki a defektust.

A második csoportba tartozó hat nyúl esetében a csípőlapátból vett spongiózus csonttal töltöttük ki a radiuson kialakított másfél centiméteres csontdefektust. Három nyúlnak jobb, háromnak pedig a bal oldalán alakítottuk ki a defektust.

A harmadik csoportba tartozó hat nyúlnak üres, csak fibronektinnel kezelt CDHA kerámiacilinderrel töltöttük ki a radiuson kialakított csontdefektusát. Három nyúlnak jobb, háromnak pedig a bal oldalán alakítottuk ki a defektust.

A negyedik csoportba tartozó hat nyúlnak előtenyésztett mezenchimális őssejteket tartalmazó, fibronektinnel előkezelt CDHA kerámiacilinderrel töltöttük ki a

radiuson kialakított csontdefektusát. Három nyúlnak jobb, háromnak pedig a bal oldalán alakítottuk ki a defektust.

Az ötödik csoportba tartozó hat nyúlnak PRP-vel bevont, fibronectinnel előkezelt CDHA kerámiacilinderrel töltöttük ki a radiuson kialakított csontdefektusát. Három nyúlnak jobb, háromnak pedig a bal oldalán alakítottuk ki a defektust.

A hatodik csoportba tartozó hat nyúlnak előtenyésztett mezenchimális őssejtekkel és PRP-vel bevont, fibronectinnel előkezelt CDHA kerámiacilinderrel töltöttük ki a radiuson kialakított csontdefektusát. Három nyúlnak jobb, háromnak pedig a bal oldalán alakítottuk ki a defektust.

### **3.9 Radiológiai utánkövetés**

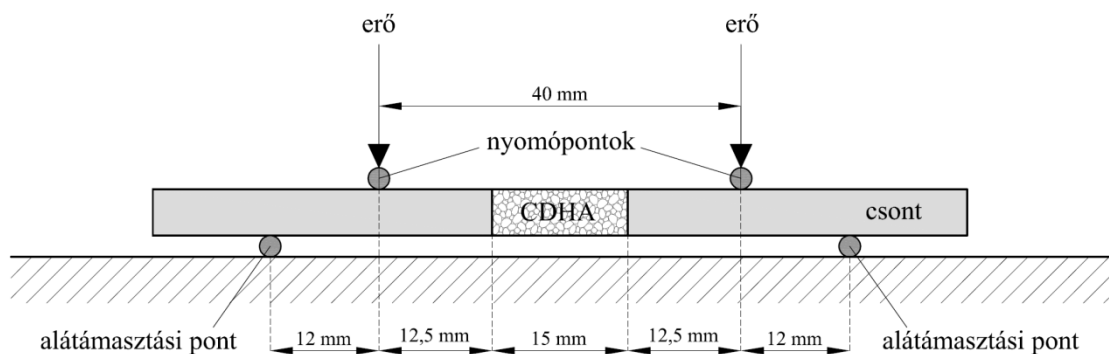
Sztandardizált anteroposztterior és laterális felvételt készítettünk az operált végtagról narkózisban közvetlenül a műtét után majd négyhetente, hogy monitorozzuk a graft helyzetét és a csontos integrációt. Nagy felbontású filmet (AGFA HAT 1000 G Plus, 18 x 24 cm; Agfa, Köln, Németország) használtunk és standard 44 kV-os és 2,2 mA-es beállítású röntgengépet (Multix Top; Siemens, München, Németország). A sugárforrás-film távolság mindig 171 cm volt. Az elkészült röntgen képeket digitalizáltuk, és így tároltuk.

### **3.10 Biomechanikai vizsgálat**

Négy pontos, nem destruktív hajlítási vizsgálatot használtunk a biomechanikai stabilitás megítélése céljából. Az állatok leölése után közvetlenül friss mintákon végeztük a vizsgálatokat Mattila és munkatársai és Reddy és munkatársai által leírt modellt adaptálva (Mattila és mtsai 1999, Reddy és mtsai 2001). Vizsgálatainkhoz a 1387 típusú Zwick készüléket (Einsingen, Ulm, Németország) használtuk. Az állatok leölése után mindkét alkar kiízesítettük a könyökízületből. Ezután a csuklóízülettől a disztális részt eltávolítottuk. Az alkar alaposan megtisztítottuk a lágyrészekről úgy, hogy a defektus területe, a beültetett kerámia és a csont se sérüljön. A négy pontos hajlítás során az ulnaris oldalt nyomtuk egymástól 40 mm-es távolságban, hogy a radius defektusát kitöltő kerámia véletlenül se sérüljön meg. A két alátámasztási pont a két

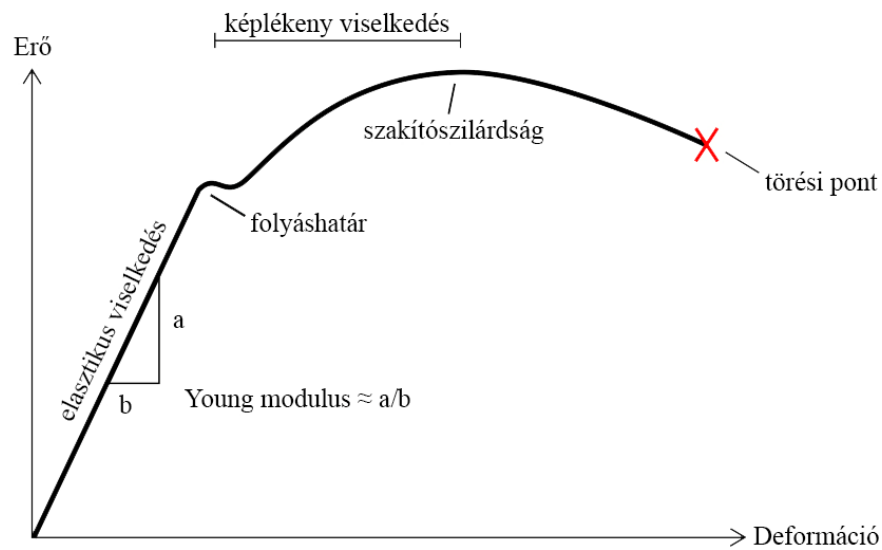
nyomási ponttól 12 mm-es távolságban volt úgy, hogy az mindig a nyomási pont defektustól távolabbi oldalán helyezkedjen el. A preparátumokat mindig úgy helyeztük el, hogy a radiuson elhelyezkedő defektus mindig a nyomó és az alátámasztó fejek középre essen (14. ábra). Mind a nyomó, mind az alátámasztó pontok 2 mm átmérőjű, lekerekített felszínek voltak, megelőzve ezzel, hogy terhelés közben belevágjanak a csontba és eltörjék azt. A vizsgálat mozgáskontrollált volt, a vizsgálófej 0.08 mm/s-os sebességgel mozgott. Az erő-elmozdulás adatait az anyagvizsgáló gép folyamatosan és automatikusan egy hozzá csatlakoztatott számítógépre juttatta és raktározta. Az erő-elmozdulás görbének (N/mm) volt egy lineáris - az elasztikus deformációra jellemző -, és egy nem lineáris - a plasztikus deformitásra jellemző - szakasza (15. ábra). A görbe lineáris, elasztikus szakaszának meredeksége segítségével meghatároztuk a rendszer merevségét (Young modulus). Hogy kiküszöböljük az egyéni különbségekből (egyéni csontminőség, csontátmérő) adódó hibákat az operált végtagok eredményeit normalizáltuk az kontralaterális, nem operált végtag merevségi adataival (így az eredményeket százalékosan tudtuk megadni). Minden ellenoldali, nem operált végtagot az operált végtaggal megegyező módon pozicionáltunk és mértünk le.

#### 4 pontos hajlítás



#### 14. ábra

*A négy pontos hajlítás során az ulnaris oldalt nyomtuk egymástól 40 mm-es távolságban. A két alátámasztási pont a két nyomási ponttól 12 mm-es távolságban volt úgy, hogy az mindig a nyomási pont defektustól távolabbi oldalán helyezkedjen el. (forrás: saját ábra)*



### 15. ábra

Az erő-elmozdulás görbéknek volt egy lineáris - az elasztikus deformációra jellemző -, és egy nem lineáris - a plasztikus deformításra jellemző - szakasza. A görbe lineáris, elasztikus szakaszának meredeksége segítségével meghatároztuk a rendszer merevségét (Young modulus). (forrás: Mattila és mtsai 1999, Reddy és mtsai 2001)

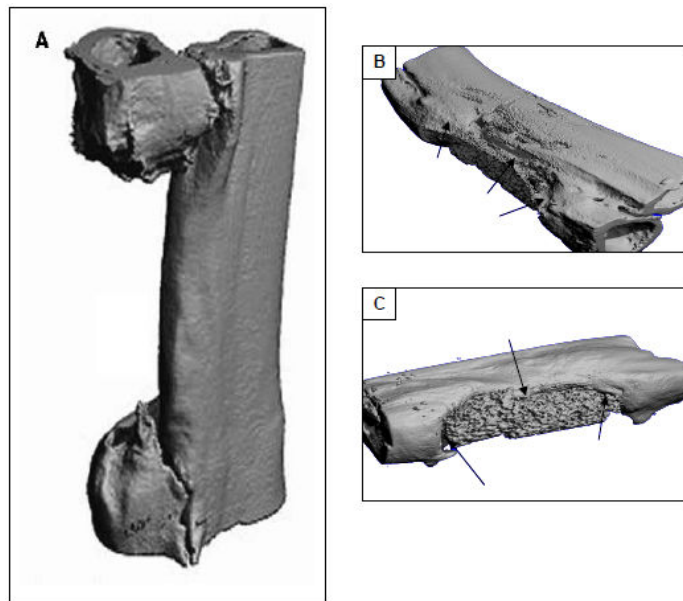
### 3.11 Mikro-CT vizsgálat

Biomechanikai vizsgálatok után a preparátumokat, melyek a 1,5 cm-es szegmentális defektus mellett tartalmaztak még fél-fél centiméter kortikális csontot proximális és disztális irányba, 70 százalékos alkoholban fixáltunk. Mindegyik csontblokkot micro-CT vizsgálat alá vontunk (Fanbeam Micro-CT; Stratec, Stuttgart, Németország). A micro-CT berendezés röntgensugárforrás mikrofókusza 7  $\mu\text{m}$  volt, az alkalmazott legnagyobb feszültség pedig 36 kV. A kép mátrixa 1024 x 1024 pixelt tartalmazott. A mintákat speciális vizet tartalmazó tárolóedényben, függőlegesen helyeztük el a gépben úgy, hogy a tároló edény és a minta hossz tengelye párhuzamos legyen. Nagy felbontású protokollt használtunk vizsgálatunkhoz (120  $\mu\text{m}$ -es szelettávolság és 60  $\mu\text{m}$ -es felbontás). A preparátum hosszától függően körülbelül 180 képszelet készült preparátumonként, azon függőlegesen haladva (16. ábra).

Ahhoz, hogy az újonnan képződött csont és a felszívódott kerámia mennyiségét meg tudjuk határozni a 8 bites képeken, meg kellett határozni a szürke skálán (0-255) a



kerámiához és az újonnan képződött csonthoz tartozó szürke érték intervallumot. Ez a folyamat a szegmentáció, melynek során vizuálisan választjuk ki és állítjuk be az adott szövethez tartozó szürke értékeket. A CDHA kerámiához a szürke skálán  $160 \pm 15$  értéket rendeltük, míg az újonnan képződött csonthoz  $60 \pm 15$  értéket. A vizuálisan beállított küszöb, mely elkülönítette a CDHA kerámiát az újonnan képződött csonttól, 100 volt, mely megbízható különbségtételt tett lehetővé a kétféle szövetféleség között. Végezetül pedig identikus síkban készített szövettani metszettel is összevetettük a mikro-CT képet, ezzel is mintegy hitelesítve az általunk választott, a két szövetféleséget elkülönítő vizuális kritériumokat (17. ábra). A digitalizált mikro-CT képeket a VG Studio Max 1.2.1 program (Volume Graphics, Heidelberg, Németország) segítségével analizáltuk, és kiszámoltuk az újonnan képződött csont mennyiségét (az újonnan képződött csont voxeleinek számát osztottuk a teljes defektus területére eső voxelek számával). A felszívódott kerámia mennyiségét úgy határoztuk meg, hogy a 16 hét után jelen lévő kerámia voxel számát elosztottuk három nem beültetett, de mikro-CT vizsgálat alá vont kerámia átlagos voxel számával.



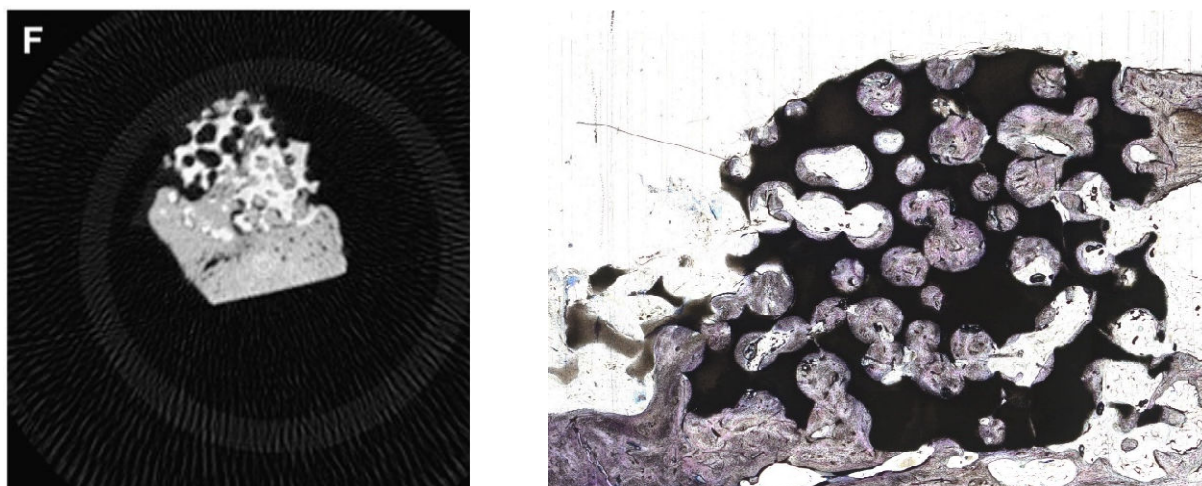
### 16. ábra

*A: Üresen hagyott defektust tartalmazó preparátum áttekintő háromdimenziós micro-CT képe,*

*B,C: CDHA-val kitöltött defektust tartalmazó preparátum áttekintő három dimenziós micro-CT kép, ahol a nyilak az újonnan képződött csontot jelölik*

*(forrás: saját fotó)*





### 17. ábra

*Identikus síkban készített szövettani metszettel is összevetettük a mikro-CT képet, ezzel is mintegy hitelesítve az általunk választott, a két szövetféleséget elkülönítő vizuális kritériumokat (forrás: saját fotó)*

### 3.12 Szövettani analízis

A biomechanikai és mikro-CT vizsgálatok után a nem dekalcinált mintákat dehidráltuk és műgyantába ágyaztuk. A próbákat a formalinból eltávolítva felszálló alkoholsorral víztelenítettük. Első lépésként szobahőmérsékleten legalább 24 órán keresztül 70 százalékos 2-Propanol (Fa. Merck, Darmstadt, Németország) oldatban tároltuk, majd 80 százalékosban, kétszer 96 százalékosban, majd háromszor 100 százalékosban. Ezután a próbákat 20 °C-on 1 napig acetonban áztattuk. Az aceton a fixáló és a beágyazó közegek közötti átmenetként szolgált. A szövetekből eltávolította a zsírt és megkönnyítette a polimerizációs oldat bejutását a preparátumokba.

A dehidráció után a mintákat Technovit (Technovit 7200 VLC, Kulzer GmbH, Wehrheim, Németország) műgyantába ágyaztuk. A beágyazás során megkülönböztettünk egyes és kettes preinfiltrációs fázist, infiltrációs fázist és a polimerizációs oldat hozzáadásának fázisát (lásd protokoll). A beágyazást speciális, zárható, kisméretű edényekben (Hereaus Kulzer, Wehrheim, Németország) végeztük. A beágyazás standardizált radius és ulna pozicionálással történt, hogy a későbbi metszések során identikus metszetek készülhessenek a különböző állatokból származó mintákból. Miután a polimerizációs oldatot hozzáadtuk a mintákhoz, az edényeket lezártuk és – 8

°C-on 3 napig inkubáltuk. Ezután eltávolítottuk a mintákat az edényekből és további 2 napig szobahőmérsékleten tartottuk, ez alatt az idő alatt a műanyag végleg megkeményedett.

A műanyag blokkok elkészülte után vágásos és csiszolós módszerrel (Exakt Apparaturbau, Hamburg, Németország) 50 µm vastag koronális síkú, a radiust és az ulnát párhuzamosan tartalmazó metszeteket készítettünk.

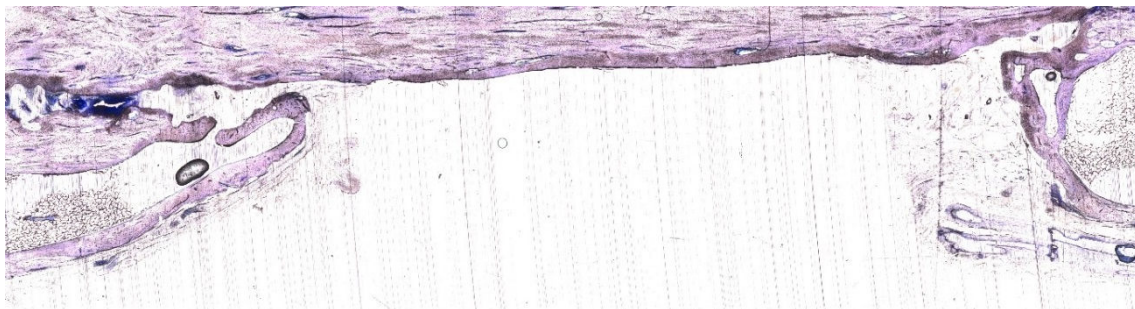
Miután a beágyazás után a műanyag teljesen kiszáradt, a műanyagba ágyazott preparátumokat először fűrészszel vágtuk, majd a metszeteket speciális csiszolóberendezéssel készítettük el.

Első lépésben a felesleges műanyagot a műanyag minták minden oldaláról levágtuk (EXAKT-Trennschleifsystem Makro; PSI Medizintechnik, Laudenbach, Németország). Majd a rögzített mintákat a csiszológépbe helyeztük (Mikro-Schleifsystem EXAKT 400 CS; PSI Medizintechnik, Laudenbach, Németország) és egy forgó, speciális csiszolópapírral (PSI Medizintechnik, Laudenbach, Németország) vízhűtés és folyamatos, állandó nyomás mellett csiszolni kezdtük.

Ezután a preparátumok felső és alsó felszínét egy speciális, műanyag lemezhez (Plexiglas XT-Farblos 2050 mm x 2 mm; Cadillac Plastic, Viernheim, Németország) ragasztottuk egy speciális ragasztó (Technovit 7200 VCL; PSI Medizintechnik, Laudenbach, Németország) segítségével. Egy speciális, kék fényű lámpával (EXAKT-Präzisionsklebepresse mit Blaulicht; PSI Medizintechnik, Laudenbach, Németország) megvilágítva a ragasztó 5 perc alatt megszáradt, a végleges száradás pedig 60 perc alatt szobahőmérsékleten következett be. Ezután az így nyert preparátumot a fűrészszel úgy vágtuk ketté, hogy a beágyazott radius és ulna egyaránt hosszában, pont közepén feleződött meg. Ezután mind a két próbadarabot a vágási felszínen csiszológéppel megmunkáltuk úgy, hogy a vágott felszínen egy lapos, csiszolt felület alakuljon ki. Ehhez egyre finomabb csiszoló és polírozó lapokat használtunk fel (P800→P1200→P2500→K4000). Ezután a fent leírt módon a minta egyik feléhez ismételten egy műanyag lapot ragasztottunk, melyet a száradás után ismételten kettéfűrészeltünk, és így a műanyag lemez az eredeti preparátumból 200-300 µm-t tartalmazott. A mintákat egyre finomabb csiszoló, polírozó lapokat használva addig csiszoltuk, míg azok vastagsága 50 µm nem lett.

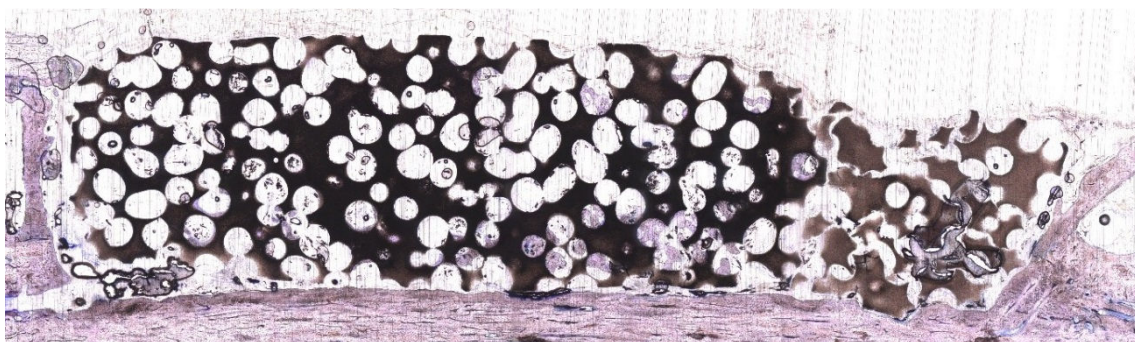
Minden állatból két metszet készült. Az egyiket Goldner féle trichrom módszerrel, másikat toluidinnel kiegészített Giemsa féle módszerrel festettük meg. Bizonyos festékek a műgyantába ágyazott vékony preparátumokba is be tudnak szívárogni, és annak a felületét meg tudják festeni, lehetővé téve különböző struktúrák, sejtek közötti differenciációt. A csiszolósos technikával készített, műanyag tárgylemezen rögzített metszeteket először Giemsa törzsoldattal (Azur-Eosin-Methylenkék; Merck, Darmstadt, Németország) majd 1 százalékos toluidinkék oldattal festettük meg (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Németország). A Giemsa festés segítségével tudunk differenciálni a sejtes és az intercelluláris részek között, a lágy és a keményebb szövetekben egyaránt. A toluidinkék festés a sejtes és normál lágyrészeket ortokromázia alapján kékre, a savas glükózaminoglikánokat pedig a metakromáziának megfelelően lilára festette. A toluidin/giemsa festés a mineralizált csontállományt a színtelentől a halványkékig festette, az oszteoid állományt világoskékre és a sejtmagokat sötétkékre (18., 19., 20., 21., 22. ábra). A festés előtt a Giemsa törzsoldatot és a toluidin oldatokat átszűrtük. A preparátumokat 5 percig 10 százalékos  $H_2O_2$  oldatban (Merck, Darmstadt, Németország) áztattuk, hogy a festék könnyebben tudjon bediffundálni. Ezt követően a próbákat desztillált vízzel mostuk, majd szárítottuk és 20 percre a Giemsa törzsoldatba helyeztük. Ezután kétszer ismét desztillált vízzel mostuk, szárítottuk, és 20 percig 1 százalékos toluidinkék oldatba tettük. Utoljára ismételt desztillációs vizes mosás után a mintákat 15 másodpercre 70 százalékos ethanolba (Merck, Darmstadt, Németország) tettük.

A metszeteket fénymikroszkóp segítségével (Axioplan 2 Imaging, Zeiss, Göttingen, Németország) vizsgáltuk, fényképeztük, digitalizáltuk, majd az Image J. (National Institutes of Health) program segítségével analizáltuk. Vizsgálataink során a vizsgáló által eltérőnek minősített szövetfélésekhez eltérő színeket rendeltünk, melyek területét pontosan meg tudtuk határozni. Így pontosan le tudtuk mérni az újonnan képződött csont területét, a kötőszövettel borított és a kerámiával borított terület nagyságát. A kapott értékeket a teljes defektus méretével elosztottuk, így normalizált százalékos értéket kaptunk (23. ábra A). Megmértük továbbá a csonttal fedett régió nagyságát a radius oszteotomizált végei mellett fekvő 3x4 mm-es interface területen (23. ábra B), valamint a radiális defektus ulnaris felén lévő területen is (23. ábra C). Ezeket az eredményeket is normalizáltuk és százalékosan adtuk meg.



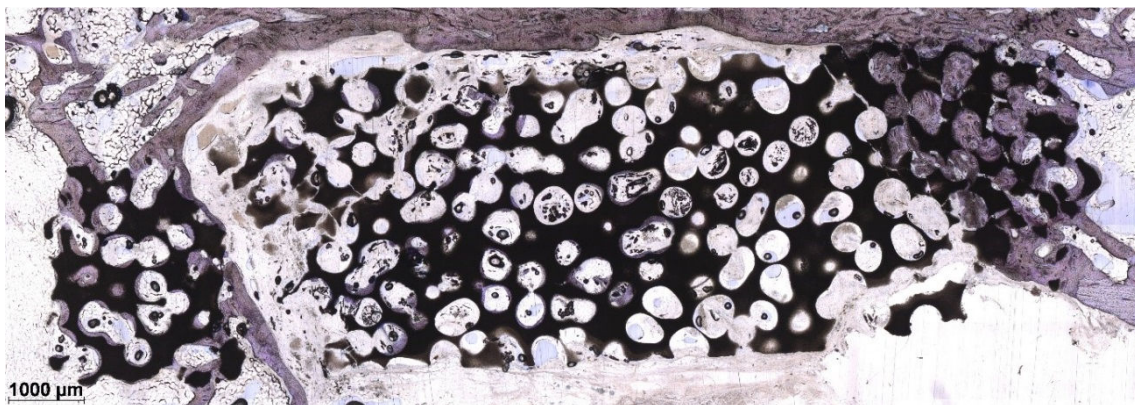
**18. ábra**

Üresen hagyott defektust tartalmazó preparátum áttekintő Toluidin-Giemsa festéssel festve. A kép jobb és bal oldalán a radiusvégek láthatóak, felső részén pedig az ulna. Csontképződés nem figyelhető meg (forrás: saját fotó)



**19. ábra**

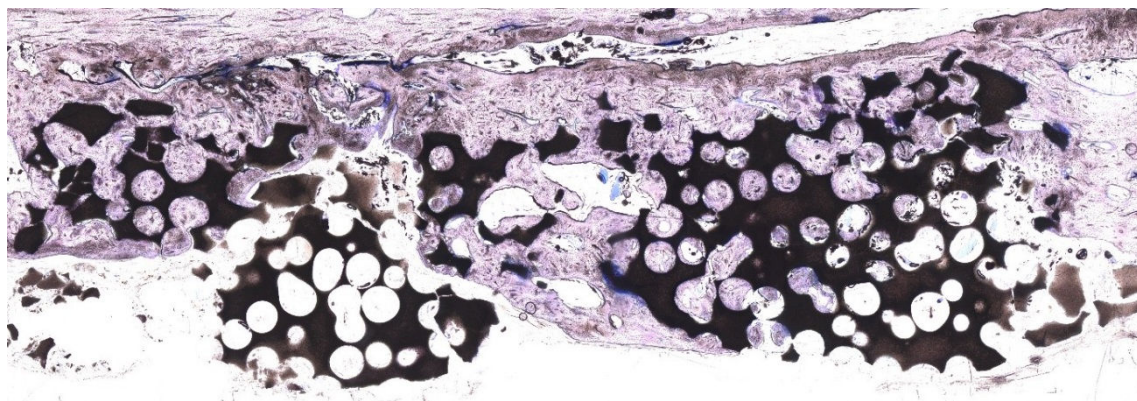
Üresen CDHA kerámiával kitöltött defektust tartalmazó preparátum áttekintő Toluidin-Giemsa festéssel festve. Mérsékelt csontképződés figyelhető meg (forrás: saját fotó)



**20. ábra**

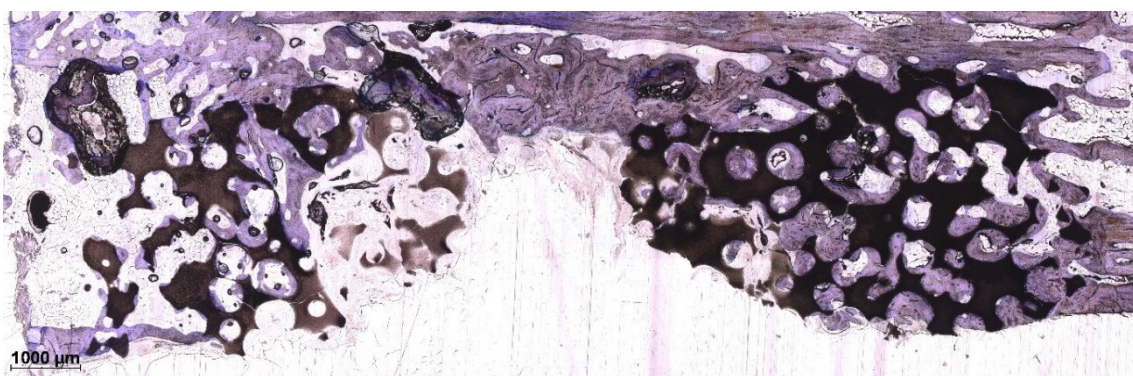
MSC+CDHA kerámiával kitöltött defektust tartalmazó preparátum áttekintő Toluidin-Giemsa festéssel festve. A kerámia többszörös törése figyelhető meg intenzív csontképződéssel (forrás: saját fotó)





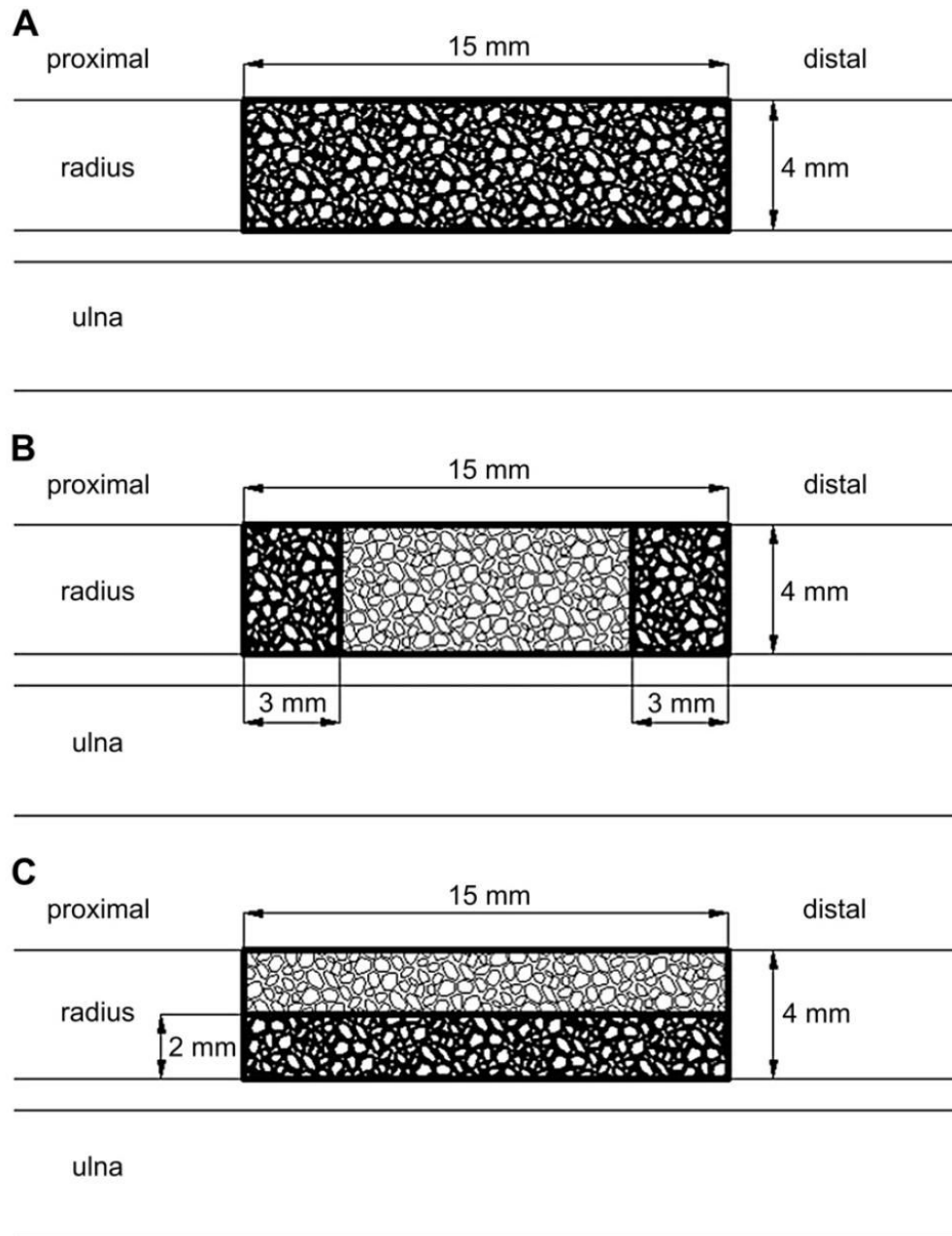
**21. ábra**

*PRP+CDHA kerámiával kitöltött defektust tartalmazó preparátum áttekintő Toluidin-Giemsa festéssel festve. A kerámia többszörös törése figyelhető meg intenzív csontképződéssel (forrás: saját fotó)*



**22. ábra**

*MSC+PRP+CDHA kerámiával kitöltött defektust tartalmazó preparátum áttekintő Toluidin-Giemsa festéssel festve. A kerámia többszörös törése figyelhető meg intenzív csontképződéssel és kerámiafelszívódással (forrás: saját fotó)*



### 23. ábra

Szövetteni vizsgálataink során különböző régiókban is megmértük a csontképződést. Azt vizsgáltuk, hogy a fogadó, szomszédos csont milyen hatással van új csont képződésére:

(A) a teljes defektus területén mért csontképződés mértéke a teljes defektus méretével normalizálva,

(B) A proximális és a disztális 3 x 4 mm-es interface régióban keletkezett csont mennyisége a teljes interface régió méretével normalizálva

(C) csontképződés az ulna melletti régióban a teljes ulna melletti régió területével normalizálva. (forrás: saját ábra)

### 3.13 Statisztikai analízis

A statisztikai analízist a SPSS for Windows 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) programmal végeztük. Minden esetben kiszámoltuk az átlagértéket és a szórást. A főbb vizsgált paraméterek a biomechanikai vizsgálattal meghatározott merevség, az újonnan képződött csont mennyisége és a mikro-CT-vel mért kerámiafelszívódás voltak. Ezeket a paramétereket többváltozós varianciaanalízissel vizsgáltuk (ANOVA). A független változók közötti különbséget post-hoc teszt segítségével vizsgáltuk (Tukey). Az interface régió és az ulnaris régió csontosodásának mértékét, valamint a teljes defektus csontosodási mértékét a Wilcoxon párosított teszt segítségével hasonlítottuk össze. Az artrózis mentes túlélési időt a Kaplan-Meier módszerrel írtuk le és a csoportok közötti különbséget Log-Rank teszttel értékeltük. Az artrózismentes túlélést befolyásoló esetleges tényezőket logisztikus regressziós analízissel vizsgáltuk (Cox-modell). A funkcionális és életminőségi eredményeket a kitöltési technika függvényében (cement vagy graft kitöltés) egyszempontos ANOVA teszttel elemeztük. Vizsgálataink során  $p < 0.05$  értéket tekintettük szignifikánsnak. Az általunk használt próbák mind kétmintás próbák voltak.

## 4. Eredmények

### 4.1 Beteganyagunk klinikai utánkövetésének eredményei

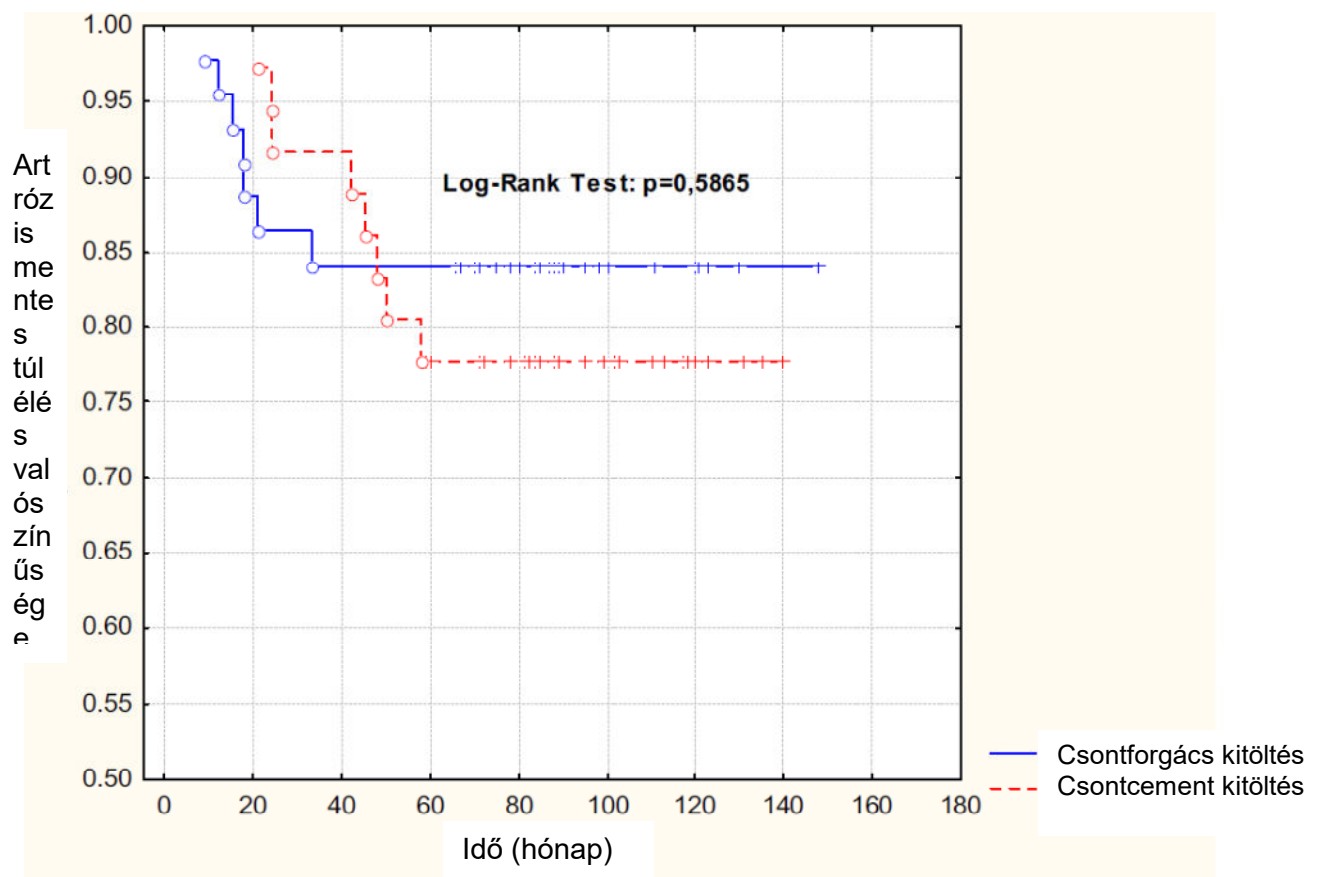
Az 199 óriássejtes csonttumoros beteg közül 129-nek volt alsóvégtagi teherviselő csontban elhelyezkedő óriássejtes csonttumora. Hetven betegnél más lokalizációban fordult elő az elváltozás (felsővégtag, medence). Anyagunkban nem szerepel szakrális, illetve csigolyát érintő elváltozás, ennek oka részben az, hogy e területeken az óriássejtes csonttumrok csak ritkán fordulnak elő, illetve hogy ezek a betegek más intézményben kerültek ellátásra. A 129 alsó végtagi lokalizációjú betegnél szubkondrális elhelyezkedésű daganat 109 esetben fordult elő (84 %). Adjuváns terápiaként 85 esetben használtunk fenolt, 44 esetben fenolos öblítés nem történt. 17 fenollal kezelt betegnél fordult elő a tumor helyi kiújulása (20 %), míg a fenollal nem kezelt betegek esetében a lokális kiújulás 16 esetben (36 %) fordult elő.

A vizsgálatokból 49 beteget zártunk ki lokális recidíva, szeptikus szövődmény vagy intraartikuláris patológiás törés miatt. Így 80 beteg vett részt a retrospektív tanulmányunkban, az átlagos utánkövetési idő pedig 84 hónap (50-148 hónap) volt. A betegek átlagéletkora 32,4 év (14-69 év) volt. A proximális femur 5, disztális femur 45, proximális tibia 19 és disztális tibia 11 beteg esetén volt érintett. A Campanacci–Enneking szerinti radiomorfológiai stádiumbeosztás szerint a 80 primer óriássejtes csonttumoros beteg közül 3 beteg tartozott az egyes, 45 beteg kettes, míg 32 beteg a hármas stádiumba. Az átlagos szubkondrális tumorérintettség Chen által kidolgozott módszer szerint mérve 27,5 százalék (15-89 %) volt (Chen és mtsai 2005).

Küretázst és csont graft beültetést 44 esetben végeztünk, míg 36 esetben a kikaparást követően cementes kitöltést alkalmaztunk. 24 hónappal a műtét után hat esetben (13,6 %) találtunk degeneratív ízületi elváltozásokat a csontforgáccsal kitöltött csoportban és három esetben (8,3 %) cementes kitöltés után. 50 hónappal a műtét után azonban ez az arány megfordult, hét esetben (15,9 %) volt látható degeneratív elváltozás a csontforgáccsal kitöltött csoportban és hét esetben (19,4 %) a cement kitöltés után. Ez a tendencia azt jelenti, hogy az első, csontforgáccsal kitöltött csoportban a második vizsgálati időszakban csak egy új artrózisos beteg jelent meg, míg a második, egyébként kisebb, csontcementtel kitöltött csoportban 4 új artrózisos eset is megjelent. A 24



hónapos posztoperatív vizsgálat során szignifikánsan kevesebb degeneratív változás volt tapasztalható a cementes kitöltés után a csont graft beültetéshez képest ( $p < 0,05$ ). Az 50 hónapos utánkövetés után, valamint később sem (50-148 hónap) volt szignifikáns különbség a két csoport között (24. ábra) ( $p > 0,05$ ). Ezen eredmények azt mutatják, hogy 24 hónap elteltével felgyorsultak a degeneratív folyamatok a cementtel kitöltött defektusok környezetében elhelyezkedő ízületekben. A kezdeti csoportok közti különbségek tehát kiegyenlítődtek az évek során. A Campanacci–Enneking szerinti radiomorfológiai stádiumbeosztás és az ízületben megjelent degeneratív elváltozások gyakorisága között nem találtunk szignifikáns összefüggést egyik vizsgálati időpontban sem ( $p > 0,05$ ). Szignifikánsan több szekunder artrózist találtunk viszont az 50 százaléknál nagyobb szubkondrális kiterjedésű daganat esetén mindkét vizsgálati időpontban ( $p < 0,05$ ).



**24. ábra**

*Artrózismentes túlélés valószínűsége különböző csontpótlási eljárások esetén*

71 páciens vett részt a Musculoskeletal Tumor Society MSTS 1987 és Short-Form-36 (SF-36) kérdőívében. Nem találtunk különbséget a funkcionális eredmények és az életminőség tekintetében a csonttal és a csontcementtel kitöltött csoportok között (2. táblázat). Nem találtunk különbséget kitöltési módszertől függetlenül vizsgálva az artrózis és az artrózis nélküli csoportok között sem a funkció és az életminőség tekintetében (MSTS 1987 ( $p>0,05$ ), SF-36 ( $p>0,05$ )).

## 2. táblázat

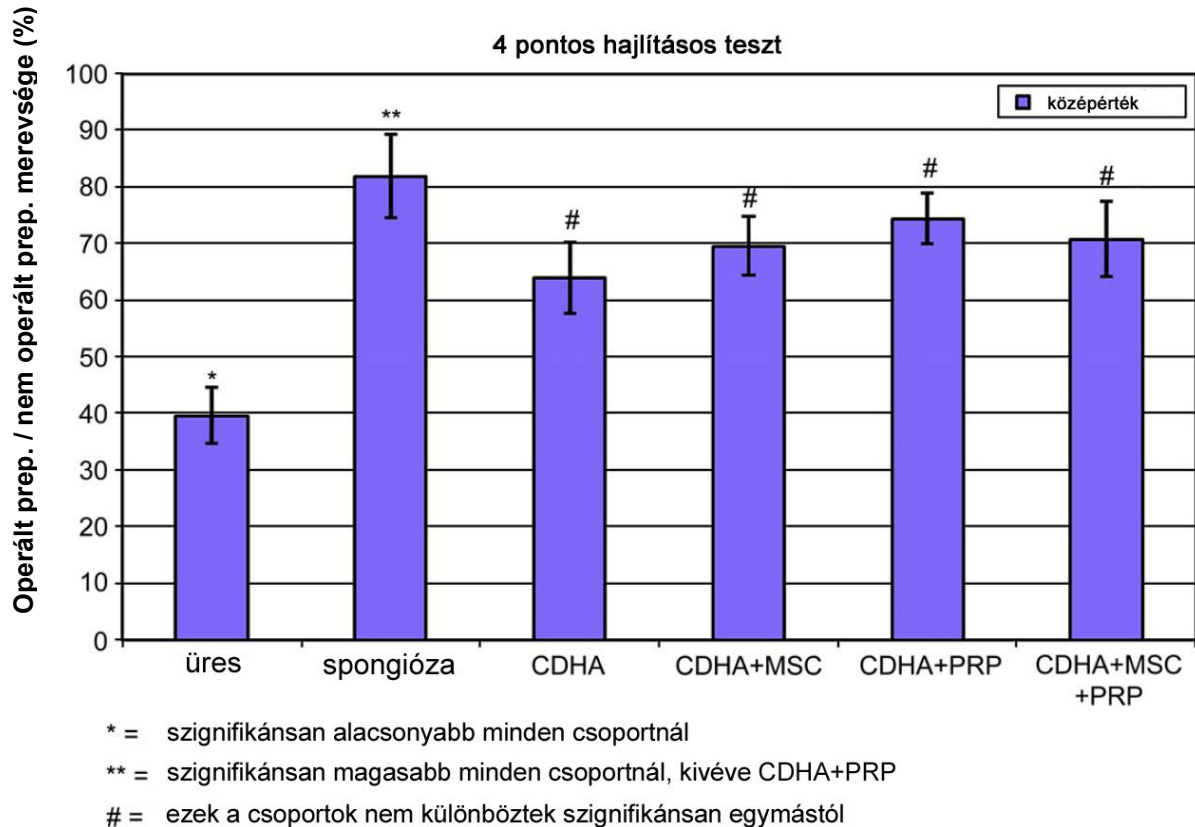
Funkcionális és életminőség vizsgálatának eredményei küretázssal kezelt óriássejtes csonttumoros betegek esetében

Tests (number of patients)	Functions assessed	Assessment score:	
		Curettage	
		Bone grafting	Cementing
Short Form-36 (bone grafting, 41; cementing, 30)	Physical function	75	80
	Role physical	77	79
	Bodily pain	74	80
	General health	81	80
	Vitality	74	72
	Social	92	86
	Role emotional	86	81
	Mental health	81	79
MSTS (bone grafting, 41; cementing, 30)	Pain	4.41	4.37
	Range of motion	4.51	4.61
	Strength	4.33	4.28
	Stability	4.83	4.79
	Deformity	4.77	4.71
	Function	4.21	4.32
	Emotional Acceptance	4.65	4.61

## 4.2 Biomechanikai eredmények

A relatív merevség szignifikánsan magasabb volt a CDHA, CDHA+MSC, CDHA+PRP és a CDHA+MSC+PRP csoportokban, mint az üresen hagyott defektussal rendelkező csoportban ( $p < 0,05$ ). Az autológ spongiózával kitöltött csoportban

szignifikánsan magasabb értékeket találtunk, mint a CDHA, CDHA+MSC és a CDHA+MSC+PRP csoportban ( $p < 0,05$ ). A különbség a CDHA, CDHA+MSC, CDHA+PRP és a CDHA+MSC+PRP csoportok között nem volt szignifikáns. Minden operált alkar merevsége kisebb volt az érintetlen, ellenoldali alkarhoz képest (25. ábra).



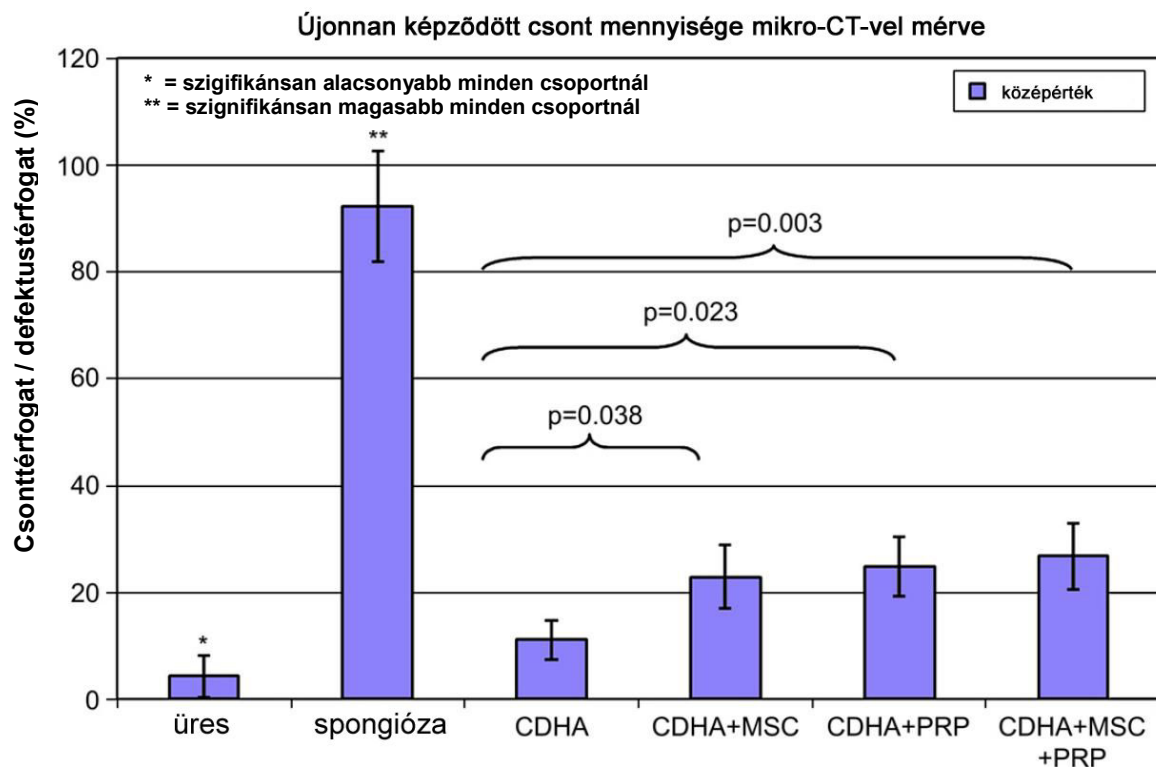
## 25. ábra

*A CDHA kerámia beültetése fokozta a merevséget minden csoportban az üresen hagyott defektushoz képest. Minden csoport közül a legnagyobb merevséget a spongiózus csonttal kitöltött csoportban észleltük.*

### 4.3 Csont térfogat és CDHA kerámia rezorpció mikro-CT-vel mérve

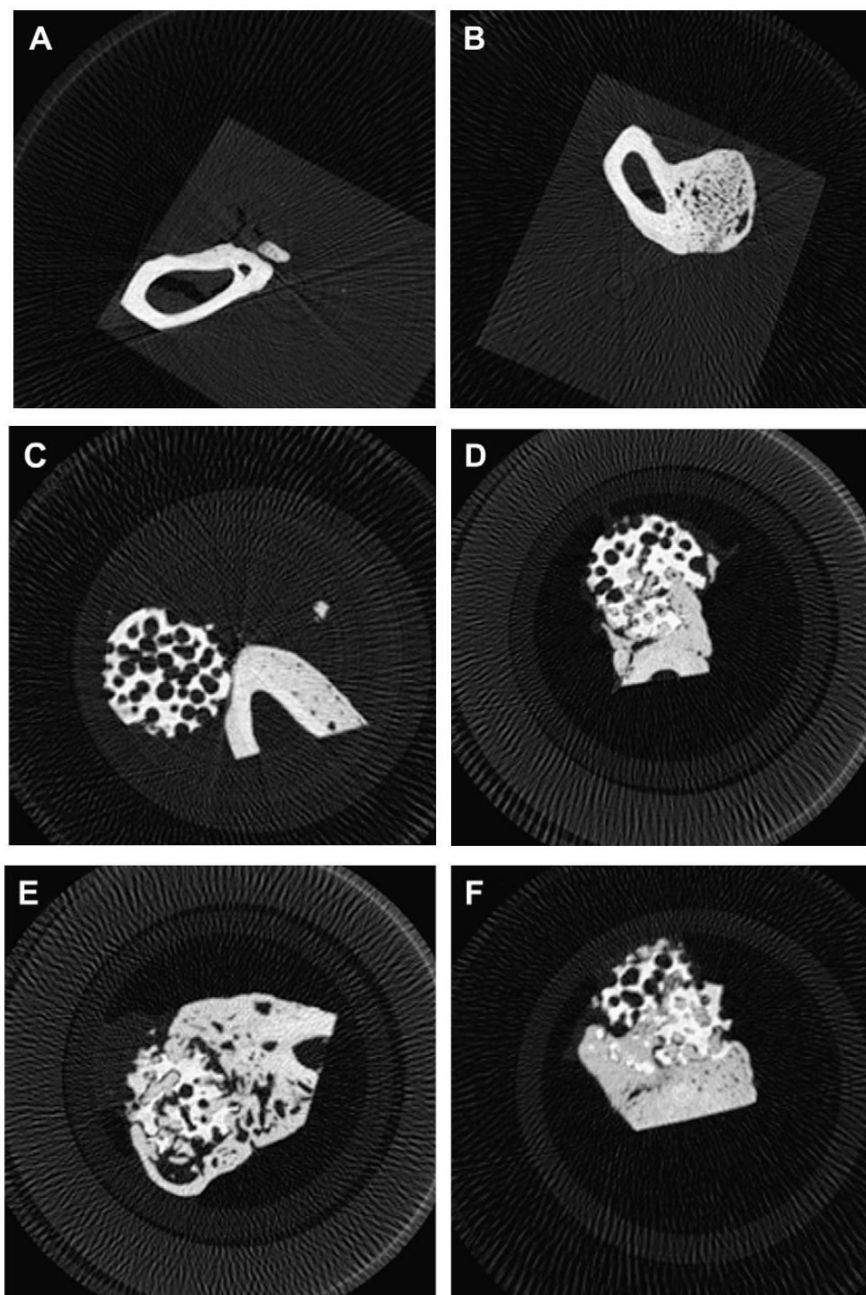
Az újonnan képződött csont mennyisége a CDHA+MSC, a CDHA+PRP és a CDHA+MSC+PRP csoportban szignifikánsan magasabb volt, mint ahol csak a CDHA kerámiát üresen tettünk be a defektusba ( $p < 0,05$ ). Az autológ spongiójával kezelt defektusok teljesen meggyógyultak. Az új csont képződése minimális volt az üresen hagyott defektusok esetén, és ez az eredmény nem különbözött szignifikánsan az üres

CDHA kerámiával kitöltött defektusokétól. Nem volt továbbá szignifikáns különbség az újonnan képződött csont mennyiségében a CDHA+PRP, a CDHA+MSC és a CDHA+MSC+PRP csoportok között (26., 27. ábra, 3. táblázat). A CDHA kerámia reziduális térfogata szignifikánsan alacsonyabb volt a CDHA+MSC, a CDHA+PRP és a CDHA+MSC+PRP csoportokban, mint az üres CDHA kerámia csoportban ( $p < 0.05$ ). Nem volt szignifikáns különbség a reziduális CDHA kerámia szempontjából a CDHA+PRP, a CDHA+MSC és a CDHA+MSC+PRP csoportok között (4. táblázat).



**26. ábra**

MSC és/vagy PRP hozzáadása a kerámiához fokozta a csontosodást az üres CDHA kerámiához képest. Nem volt szignifikáns különbség a CDHA+MSC, CDHA+PRP és a CDHA+PRP+MSC csoportok között.



## 27. ábra

Ezek a mikro-CT képek az operált alkarok reprezentatív transzverzális metszeteit mutatják a defektus középső részén  $30\mu\text{m}$ -es felbontással a műtét után 16 héttel.

A: üresen hagyott defektus,

B: autológ spongiózával kitöltött defektus, C: üres CDHA kerámiával kitöltött defektus,

D: MSC-vel bevont CDHA-val kitöltött defektus,

E: PRP-vel bevont CDHA kerámiával kitöltött defektus,

F: MSC-vel és PRP-vel kezelt CDHA-val kitöltött defektus (forrás: saját fotó)

**3. táblázat**

Újonnan képződött csont mennyisége mikro-CT-vel mérve. A különböző betűkkel jelölt csoportok között szignifikáns különbség volt, az azonos betűvel jelölt csoportok között pedig nem volt szignifikáns különbség. (post-hoc – ANOVA teszt).

Független változó	Csoportok	Középérték ± szórás (%)	<i>n</i>	Post-hoc összehasonlítás	p érték
Újonnan képződött csont mennyisége %-ban	Üres	4.2 ± 3.9	6	a	<0.0001
	Szpongiózával kitöltött	92.33 ± 10.42	6	b	
	CDHA	11 ± 3.58	6	a	
	CDHA+MSC	22.83 ± 5.98	6	c	
	CDHA+PRP	24.8 ± 5.54	6	c	
	CDHA+MSC+PRP	26.67 ± 6.28	6	c	

**4. táblázat**

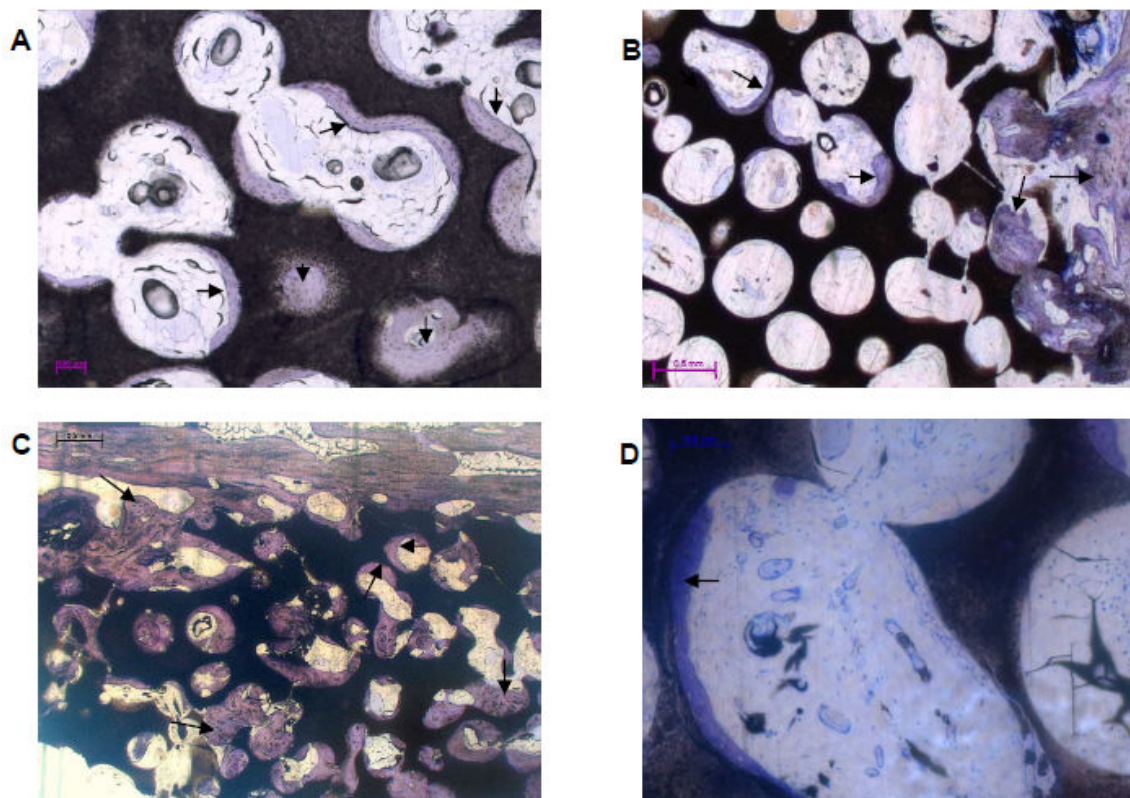
Kerámiák biodegradációja mikro-CT-vel mérve. A különböző betűkkel jelölt csoportok között szignifikáns különbség volt, az azonos betűvel jelölt csoportok között pedig nem volt szignifikáns különbség. (post-hoc – ANOVA teszt).

Független változó	Csoportok	Középérték ± szórás (%)	<i>n</i>	Post-hoc összehasonlítás	p érték
A kerámiák felszívódása mikro-CT-vel mérve	CDHA	75 ± 8.09	6	a	<0.0005
	CDHA+MSC	61.83 ± 5.74	6	b	
	CDHA+PRP	57 ± 7.17	6	b	
	CDHA+MSC+PRP	60.16 ± 7.88	6	b	

#### 4.4 Szövettani eredmények

A szövettani eredmények (28. ábra) megfeleltek a mikro-CT-vel mért és a röntgeneken látható eredményeknek (29. ábra). Az üresen hagyott defektusokban érdemi csontképződést nem tudtunk megfigyelni. Az autológ átültetett csont integrálódott a lokális csonthoz proximálisan és disztálisan is. Az újonnan képződött csontos terület nagyobb volt a CDHA+MSC-vel és a CDHA+MSC+PRP-vel kitöltött defektusok esetén, mint az üres CDHA kerámiával kitöltött defektusok esetén ( $p < 0.05$ ) (30. ábra). A csontdefektus ulnaris fele ( $p = 0.0005$ ) és az interface területe ( $p = 0.006$ ) szignifikánsan több csontot tartalmazott, mint a totális defektus a CDHA+MSC, CDHA+PRP és a CDHA+MSC+PRP csoportokban (31. ábra). A szövettani metszeteken limfocita, többmagvú óriássejtek és makrofágok jelenlétét is vizsgáltuk, de nem találtunk a csoportok között különbséget. A csont szinte mindig a CDHA scaffold pórusainak perifériás részén képződött úgy, hogy a csont és a kerámia között nem volt megfigyelhető egy fibrózus réteg. Az interface régióban a kerámiapórusok szinte teljes egészében csonttal voltak kitöltve. Ez a két utóbbi megfigyelés a CDHA kerámia oszteokonduktív tulajdonságának bizonyítéka.





## 28. ábra

A: a fekete nyíl újonnan képződött csontra mutat, melyet Toluidin-Giemsa festékkal festettünk (skála 100  $\mu$ m)

B: a kép jobb oldalán erőteljes csontképződés figyelhető meg Toluidin-Giemsa festéssel, ahol a kerámia a radiushoz fekszik (skála 0,5 mm)

C: a kép felső részén erőteljes csontképződés figyelhető meg Toluidin-Giemsa festéssel, ahol a kerámia az ulnának fekszik (skála 0,5 mm)

D: a fekete nyíl újonnan képződött csontra mutat, melyet Toluidin-Giemsa festékkal festettünk (skála 100  $\mu$ m)

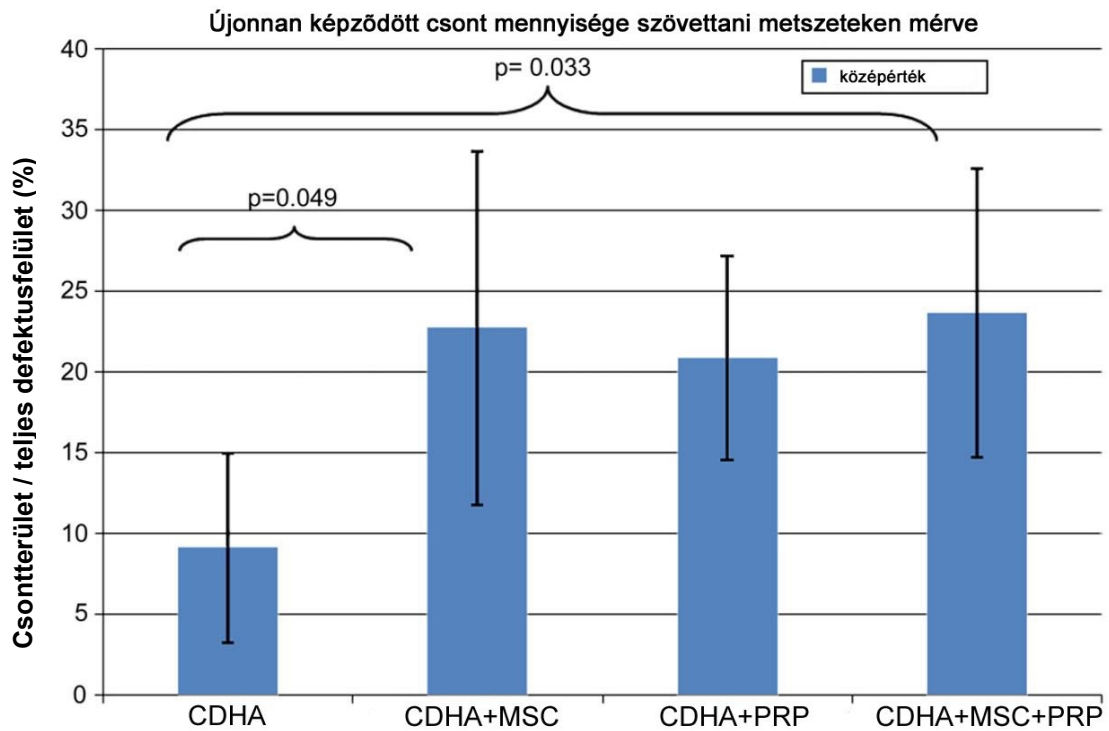
(forrás: saját fotó)





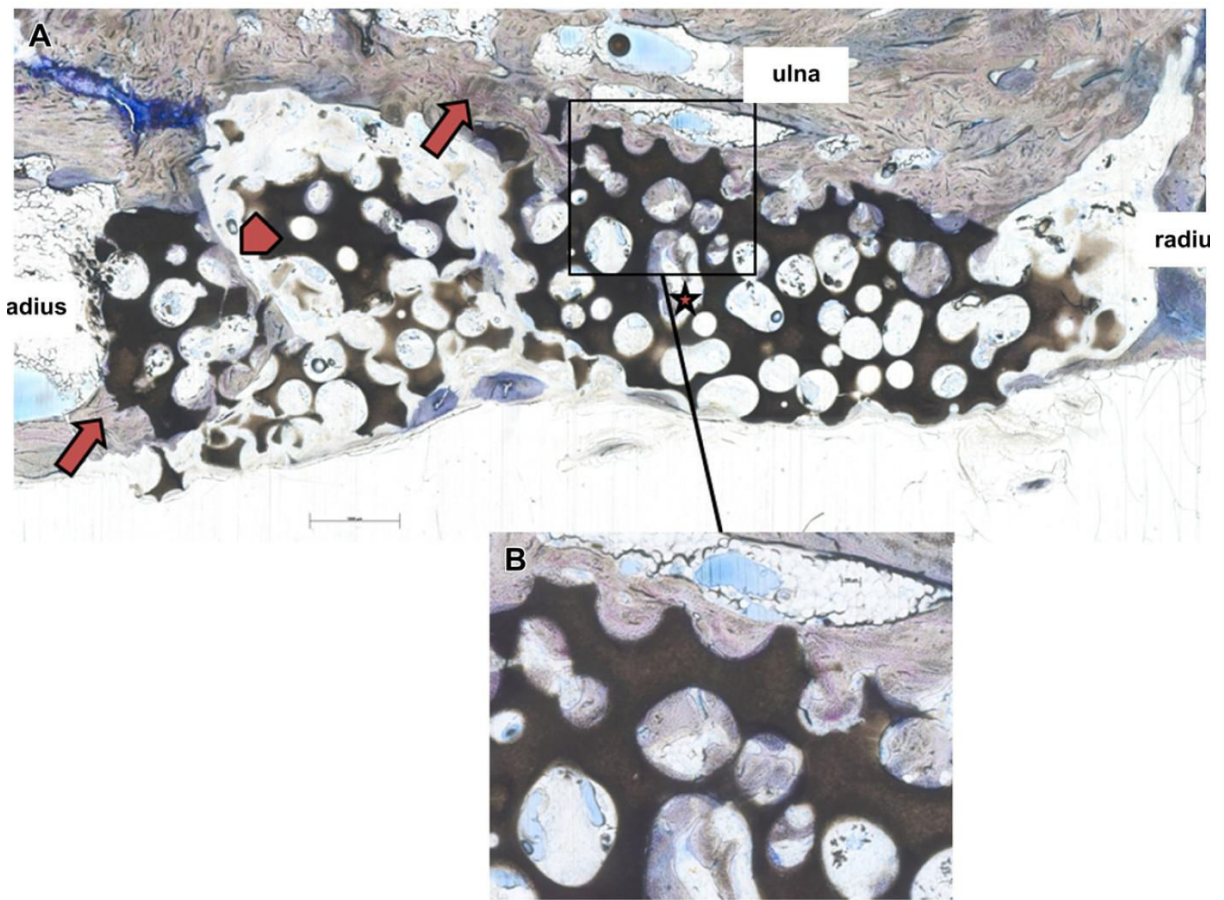
29. ábra

Anteroposterior (A) és laterális (B) röntgenképek kerámia+PRP+MSC csoportba tartozó nyúl alkarjáról közvetlenül a műtét után. Tizenhat héttel a műtét után erős biológiai reakció látható új csont képződése mellett az AP (C) és oldal irányú (D) röntgenfelvételeken (forrás: saját fotó)



30. ábra

Szövettani metszeteken az újonnan képződött csont területe magasabb volt a CDHA+MSC-vel és a CDHA+MSC+PRP-vel kitöltött defektusok esetén ( $p < 0.05$ ).



### 31. ábra

(A) Ez a CDHA+PRP+MSC csoportba tartozó toluidin kék festett preparátum a kerámia kiváló csontos integrációját mutatja a fogadó radiushoz (nyilak), 10-szeres nagyítás mellett. A kerámián belül törések alakultak ki, melyeket csont tölt ki (nyílfej). A mélyebben elhelyezkedő pórusokban is megfigyelhető csontképződés (csillag).

(B) 40-szeres nagyítás mellett jól látható, ahogyan oszteoblasztok nőnek a kerámia felszínén és a pórusok belsejében egyaránt.

(forrás: saját fotó)

## 5. Megbeszélés

### 5.1 Klinikai eredményeink megbeszélése

Ma a küretázst követő csontcement kitöltés számít a legelfogadottabb sebészi eljárásnak az ízületek közelében elhelyezkedő, nagyméretű cisztikus defektusokkal járó csontdaganatok, mint például az óriássejtes csonttumor, az aneurizmás csontciszta és a kondroblasztóma kezelésében (Labs és mtsai 2001, Ozaki és mtsai 1997). Az, hogy a szubkondrálisan elhelyezkedő csontcement károsítja az ízületi porcot és következményes szekunder artrózishoz vezet, több szerzőben felmerült, de igazolni nem sikerült (Campanacci és mtsai 1975, Frassica és mtsai 1993, Hisatome és mtsai 2002), Leírták viszont a szubkondrálisan alkalmazott autológ csontforgács jótékony hatását a szubkondrális anatómia és funkció visszaállításában (Johnston 1987, Welch és mtsai 2002). A szubkondrális csontnak a porc tápanyagellátásában kevés szerepe van, de annál fontosabb a feladata az energiaelnyelés szempontjából. Radin és munkatársai nyúl térdízületi modellen ismétlődő kompressziós erő segítségével kisméretű töréseket hoztak létre a szubkondrális csontszövetben. A törések fokozott kalluszképződéssel gyógyultak, és jelentősen növekedett a szubkondrális trabekuláris csontszövet sűrűsége, mely által keményebbé, merevebbé vált. Így már nem tudta ellátni biomechanikai, energiaelnyelő funkcióját és megkezdődött a térdízületi porc felgyorsult degenerációja, majd az ízületek artrotikus átalakulása (Radin és mtsai 1984, 1986).

Munkánk első felében ismertetett retrospektív vizsgálatunknak az volt a célja, hogy értékelje és összehasonlítsa a szubkondrálisan elhelyezkedő óriássejtes csonttumороk kezelése során használt két különböző csontpótló eljárás, a csontcement és a homológ csontforgács hatását az alsó végtag teherviselő ízületeiben kialakuló szekunder artrózis kialakulásában.

Modern képalkotó technikák, a funkcionális biológia és szisztémás kezelések gyors fejlődése ahhoz vezetett, hogy paradigmaváltás következett be az óriássejtes csonttumороk kezelésében, és a korábbi, döntően sebészi kezelés multidiszciplináris terápiává alakult át. A sebész számára a döntő kérdés az, hogy a nagyjából hasonló szövettani képet mutató óriássejtes csonttumороk közül melyiknél számíthat kiújulásra, továbbá ha kiújul a daganat, úgy a kiújulás ártalmatlan, a korábbi tökéletlen kikaparás

eredménye-e, meg lehet-e ismételni a kikaparást, meg lehet-e tartani a környező ízületet a jobb életminőség reményében, vagy a kiújulás malignus transzformáció következménye. Az irodalmat alaposan áttanulmányozva megállapíthatjuk, hogy nincs egyértelmű szövettani vagy genetikai faktor, mely segítségével jelezni lehetne egy adott óriássejtes csonttumor várható lokális progresszióját, kiújulásának vagy távoli metasztázisának megjelenési kockázatát. Az óriássejtes csonttumor lágyrészekbe terjedése az egyetlen igazi olyan faktor, amely erősen növeli a helyi kiújulás kockázatát. Ez a tény egyszerre magyarázható egy esetleges agresszívabban viselkedő óriássejtes csonttumorról, illetve a lágyrészekbe terjedő daganat eltávolításának és lokális adjuvánsok felhasználásának nehézségeivel. Gyakran találkozunk óriássejtes csonttumor felismerésekor patológiás töréssel is (15-20 %), de a patológiás törés nem növeli a későbbi helyi kiújulás kockázatát (Salunke és mtsai 2015). Fontos lenne a neoplasztikus stromális sejtek célzott vizsgálata ezen daganatfőleség jobb megismerése céljából. Jelenleg is több munkacsoport dolgozik párhuzamosan egy jól felhasználható, neoplasztikus és reaktív sejtek közötti kölcsönhatások vizsgálatára is alkalmas, a tumor növekedés és metasztatizálódás jobb megértését szolgáló in vivo modell megalkotásán (Lau és mtsai 2015).

Célunk, hogy a jobb funkció és életminőség elérése érdekében minél több beteg esetében végezhesünk intralézionális küretázst, és a rosszabb funkcionális eredménnyel és több szövődménnyel járó (allograft törés, álízület, tumorprotézis mechanikai szövődménye, aszeptikus lazulás, szeptikus folyamat) en-bloc rezekciós műtétek aránya csökkenjen. En-bloc rezekciós műtétet olyan beteg esetén érdemes végezni, ahol az intralézionális műtét esetlegesen szisztémás kezeléssel kiegészítve sem kivitelezhető, kontraindikált vagy nem elérhető. Ilyen eset lehet, amikor az óriássejtes csonttumor intraartikuláris töréssel párosul, amikor küretázs után ízületi rekonstrukció nem végezhető, nagyméretű lágyrészkomponens neurovaszkuláris képleteket involvál vagy olyan csontot érint, mely funkcióvesztés nélkül feláldozható (disztális ulnavég vagy a proximális fibulavég). Extraartikuláris, elmozdulás nélküli törések esetén érdemes a műtéttel megvárni a törés konszolidációját, de intraartikuláris vagy diszlokált törések esetén érdemes azonnali, rezekciós műtétet végezni (Eckardt és mtsai 1986, Szendrői és mtsai 1989).

Retrospektív vizsgálatunk alapját képező 129 alsó végtagi lokalizációjú, küretázssal kezelt óriássejtes csonttumoros beteg közül 85 esetben használtunk fenolt

adjuváns terápiaként, 44 esetben nem történt fenolos öblítés. 17 (20 %) fenollal kezelt betegnél fordult elő a tumor helyi kiújulása, míg a lokális kiújulás 16 esetben (36 %) fordult elő a fenollal nem kezelt betegek esetében. Ezek az eredmények megfelelnek az irodalmi adatoknak (Salunke és mtsai 2015). Célunk elérését tovább segíti a jelenleg elterjedőben lévő neoadjuváns denosumab terápia, melynek segítségével olyan esetekben is elérhetővé válik jó funkcionális eredménnyel járó intralézionális műtét, amelyeknél korábban ez elképzelhetetlen volt (Mattei és mtsai 2014). További kutatások, megfigyelések szükségesek azonban a denosumab biztonságos felhasználhatóságának, hatékonyságának tisztázása érdekében. A denosumab a RANKL gátlásán keresztül csak közvetetten éri el a neoplasztikus stromális sejteket, a tumoros komponensre direkt hatása nincs. Jelenlegi tudásunk szerint a denosumab hatása valószínűleg csak ideiglenes, mert a terápia lezárulta után több beteg esetében is megfigyelték a daganat ismételt megjelenését, illetve a csont és lágyrészkomponens együttes növekedését (Gaston és mtsai 2016). Sebészeti szempontból nem megoldható óriássejtes csonttumoros esetekben felmerül az egész életen át tartó denosumab kezelés lehetősége is, de előtte pontosan tisztázni kell a minimálisan hatásos dózist, az optimális adagolást és egy esetleges intervallumkezelés részleteit. Sok központban adjuváns, műtét utáni környezetben is rendelkezésre áll annak ellenére, hogy nem rendelkezünk megbízható adattal arról, hogy műtétet követően csökkenti-e a lokális kiújulás kockázatát. A legtöbb szerző 3-4 hónapos neoadjuváns kezelést tart optimálisnak (Müller és mtsai 2016). Általában ennyi idő szükséges ahhoz, hogy egy korábban kikaparással nem kezelhető, nagy lágyrészkomponenssel rendelkező daganat körül kialakuljon egy szklerotikus gyűrű, mely megjelenése után könnyebben lehet ízületmegtartó műtétet végezni (Gerrand és mtsai 2016). Amennyiben azonban en-bloc rezekció a cél, akkor érdemes hosszabb ideig alkalmazni a neoadjuváns denosumab terápiát, így maximális meszesedést elérve könnyebben elvégezhető a radikálisabb rezekciós műtét.

A polymetil-metakrilát (PMMA) azzal az előnnyel rendelkezik, hogy a polimerizáció exoterm reakciója során felszabaduló hőhatás a környező szöveteket is felmelegíti, elpusztítva a kikaparás után visszamaradt tumorsejteket (Johnston 1987). Azonnali mechanikai alátámasztást nyújt a porcszövet számára és megakadályozza a porc és a szubkondrális szövet összeroppanását, törését (Frassica és mtsai 1993). A PMMA-val elért azonnali stabilitás lehetővé teszi a műtétet követő lágyrészgógyulás

után a korai mobilizálást, gyógytornát, így gyorsabban elérhető a maximális funkció. A radiológiai utánkövetés a csontcement környezetében könnyű, egyértelmű, hiszen a kiújulás vagy a szekunder elváltozások képe jelentősen eltér a csontcement radiológiai megjelenésétől, és így korán és pontosan lehet észrevenni egy esetleges lokális recidívát. Lokális recidíva esetén a küretázs és a csontcement-kitöltés megismételhető (Labs és mtsai 2001, Ozaki és mtsai 1997). A fenti előnyök ellenére egyre több publikáció megkérdőjelezi a PMMA felhasználhatóságát ezen defektusok kitöltésére (Blackley és mtsai 1999, Mcgough és mtsai 2005). A PMMA egyik hátránya, hogy nem biodegradábilis, és biológiailag nem tud integrálódni a környező csontba (Welch és mtsai 2002). Welch és munkatársai egy szklerotikus gyűrű kialakulását figyelték meg a csontcement környezetében, mely fokozott trabekuláris csontképzés következménye. Ennek a szklerotikus csontrétegnek a kialakulása figyelhető meg az ízületi porc és a szubkondrális csontréteg alatt is, elkülönítve a cementet a környező csonttól és a szubkondrális csontrétegektől. Ezen szklerotikus réteg egyértelműen csökkentheti a szubkondrális lemez mechanikai rezgéselnyelő képességét. A PMMA használat során hőhatás miatt termális nekrozis kialakulásával is kell számolni a szubkondrális régió vagy az ízületi porc területén (Fassica és mtsai 1993).

Csontforgácsot is széles körben használnak csontdefektusok kitöltésére, de sem az autológ csont, sem a homológ csont nem tud azonnali, megfelelő mechanikai alátámasztást biztosítani a szubkondrális elhelyezkedő defektusoknak. Állatmodellek igazolták, hogy a szubkondrális szilárdság csak kicsivel nagyobb a zömített spongiózus csonttal kitöltött defektusok esetén, mint az üresen hagyott defektusok területén (Hopp és mtsai 1989). Ennek következtében nagy az esélye a szubkondrális csont kollapszusának, törésének és az ízületi porc károsodásának. Az átültetett csont teljes átépülése után azonban a szubkondrális csontlemez teljes funkcióját visszanyerheti. Állatkísérletes eredmények alapján, melyeket saját eredményeink is alátámasztanak, teherviselő ízületek környezetében végzett, csontforgáccsal való kitöltés után két évig, a szubkondrális csontlemez ismételt kialakulásáig kell fokozott kockázattal számolni esetleges degeneratív elváltozások kialakulása szempontjából (Frassica 1993).

A szubkondrális csont sérülése kialakulhat a műtét során is, amikor intenzíven kikaparjuk a daganatot, és ez a károsodás egyértelműen fokozza a későbbi artrózis kialakulásának esélyét (Welch és mtsai 2002). Amennyiben ilyen intenzív, agresszív

kikaparás történik, és a kikaparás során jelentősen sérül a szubkondrális csontlemez, akkor a későbbiekben jelentkező artrózis kialakulását nem befolyásolja, hogy a csonttüreget cementtel vagy csontgrafttal töltöttük ki.

A regiszterünkben nyilvántartott 199 óriássejtes csonttumoros beteg daganata az esetek 56 százalékában elérte a szubkondrális régiót (3 mm-en belül), ez az arány alsó végtagi lokalizáció esetén 84 százalék volt. A gyakori szubkondrális érintettség miatt a legtöbb, ezen tumorok ellátásával foglalkozó centrumban intralézionális küretázásra törekednek, hogy meg tudják őrizni az adott ízületet, és így jobb funkcionális eredményt érjenek el. Egy esetleges rezekciós műtét ugyan csökkenti a daganat helyi kiújulásának esélyét, azonban az ízület feláldozása révén rontja a funkcionális eredményeket is (Dreihöfer és mtsai 1995, Liu és mtsai 1998).

Munkánk során a csontcement és a homológ csontforgács hatását vizsgáltuk szubkondrálisan elhelyezkedő defektusok kitöltése után az ízületi degeneráció szempontjából. Az egyéb, degeneratív elváltozások kialakulásának esélyét növelő faktorok eliminálása céljából beteganyagunkból kizártuk a patológiás törést szenvedett betegeket, valamint azokat a betegeket, akiknél a műtét után szeptikus szövődmény lépett fel, vagy a daganat recidívált. Az első két folyamat direkt módon képes károsítani a szubkondrális csontot és az ízületi porcot, míg a tumor kiújulása esetén a porc nagy valószínűséggel sérülhet az ismételt küretázs során. Küretázst és csont graft beültetést 44 esetben végeztünk, míg 36 esetben a kikaparást követően cementes kitöltést alkalmaztunk. 24 hónappal a műtét után hat esetben (13,6 %) találtunk degeneratív ízületi elváltozásokat a csontforgáccsal kitöltött csoportban és három esetben (8,3 %) cementes kitöltés után. 50 hónappal a műtét után azonban ez az arány megfordult, hét esetben (15,9 %) volt látható degeneratív elváltozás csontforgáccsal kitöltött csoportban és hét esetben (19,4 %) a cement kitöltés után. Ez a tendencia azt jelenti, hogy az első, csontforgáccsal kitöltött csoportban a második vizsgálati időszakban csak egy új artrózisos beteg jelent meg, míg a második, egyébként kisebb, csontcementtel kitöltött csoportban 4 új artrózisos eset is megjelent. A 24 hónapos posztoperatív vizsgálat során szignifikánsan kevesebb degeneratív változás volt tapasztalható a cementes kitöltés után a csont graft beültetéshez képest. Az 50 hónapos utánkövetés után, valamint később sem (50-148 hónap) volt szignifikáns különbség a két csoport között. Ezen eredmények azt mutatják, hogy a 24 hónap elteltével felgyorsultak a degeneratív folyamatok a cementtel

kitöltött defektusok környezetében elhelyezkedő ízületekben. A kezdeti csoportok közti különbségek tehát kiegyenlítődtek az évek során.

Egy 1987-es Muszkuloszkeletális Onkológiai Szimpózium egyik fő témája a PMMA szerepe volt végtagmegtartó műtétek esetén. Öt nagyobb, óriássejtes csonttumoros beteg anyagát feldolgozó munkát ismertettek, és úgy találták, hogy a PMMA mint lokális adjuváns használata után a helyi kiújulás 15 százalékra csökken, mely szignifikánsan kevesebb, mint a 40-50 százalékos kiújulási gyakoriság a korábbi, adjuváns kezelés nélküli küretázs esetén. Ugyanezen szériák feldolgozása alapján a szekunder artrózisok gyakorisága cementes kitöltés után csupán 12 százalék volt. Ezen eredményeket azonban kritikusan kell szemlélni, mert nem differenciáltak a szubkondrális lokalizáció szempontjából, és az utánkövetési idő is rövid volt (Enneking 1987). A mi eredményeink alapján fokozott a hajlam az oszteoartrózisra csont graft beültetés esetén az első két postoperatív évben, majd azonban a csontos átépülés lezárulta után további degeneratív elváltozás nem várható. A cementtel kezelt csoportban ennek a fordítottja igaz, az artrózis kialakulásának valószínűsége alacsony volt az első két évben, majd az idő múlásával egyre több artrózis megjelenésével kell számolni.

Számos szerző ajánlja a recidíva kockázatának csökkenése után a csontcement eltávolítását, és az így kialakult csontüreg csonttal való kitöltését annak érdekében, hogy a cement ne károsítsa az ízületet (Ozaki és mtsai 1997). Mi ezt nem tartjuk jó megoldásnak, mivel az ismételt műtét növeli a szubkondrális csontszerkezet és az ízületi porc intraoperatív károsodásának esélyét. Továbbá egy ilyen eljárás a korábban már tárgyalt probléma elhalasztását jelenti, mivel az ízületi porc és a fennmaradó szubkondrális csontlemez hosszú időre stabil alátámasztás nélkül marad, egészen addig, amíg az átültetett csont át nem épül.

Chen és munkatársai szerint, ha a tumor 3 mm-nél közelebb helyezkedik el az ízületi porchoz, akkor a szubkondrális régió érintett (Chen és mtsai 2005). Egy tanulmány igazolta, hogy a szekunder artrózis esélye nagyobb, ha a daganat 10 mm-nél közelebb helyezkedik el az ízületi porchoz (Xu és mtsai 2013). Szekunder artrózis kialakulásában további fontos tényező lehet a szubkondrálisan érintett terület nagysága is. Kimutatták egy 56 óriássejtes csonttumoros beteget 86 hónapos utánkövetés után feldolgozó munkában, hogy szubkondrális lokalizáció esetén a szekunder artrózis



gyakorisága 4,2-szer volt magasabb a szubkondrális régiót nem érintő daganatokhoz képest, valamint szubkondrális lokalizáció esetén, ha az több mint a szubkondrális csont 70 százalékát érintette, akkor az artrózis gyakorisága több mint kilencszeres volt a kisebb daganatokhoz képest (Van der Heijden és mtsai 2012). Tanulmányunk másik eredménye az az összefüggés, mely leírja, hogy a szubkondrális csont érintettsége egyértelműen összefügg a későbbi ízületi szekunder degeneratív elváltozások kialakulásával. Szignifikánsan több szekunder artrózt találtunk az 50 százaléknál nagyobb szubkondrális kiterjedésű daganatok esetén ( $p < 0,05$ ).

Alternatív lehetőséget jelenthet az autológ vagy homológ csontszövet transzpozíciója a megmaradt porclemmez vagy szubkondrális csonttréteg és a beültetett csontcement közé, így megelőzve a degeneratív elváltozásokat (Malawer és mtsai 1999). A csontátültetéshez képest azonnali teljes alátámasztást biztosít ez a módszer, viszont lehetőséget nyújt a funkcionálisan fontos szerepet betöltő szubkondrális csontlemez ismételt kialakulásához. Ezen kombinált módszer alkalmazása esetén a csontcement felmelegedése okozta lokális adjuváns hatás a szubkondrális régióban elmarad. Véleményünk szerint a szubkondrális csontlemez újdonszerűsége fontos, ezért ez a kompromisszum vállalható.

Érdemes azonban megjegyezni, hogy a magas szekunder artrózis arány ellenére mind az MSTs-pontszám által leírt funkcionális eredmények, mind a SF-36 felmérés által értékelt életminőségi paraméterek igen jónak bizonyultak beteganyagunkon. Nem találtunk különbséget a funkcionális eredmények és az életminőség tekintetében a csonttal és a csontcementtel kitöltött csoportok között. Érdekes, de szintén nem találtunk különbséget kitöltési módszertől függetlenül vizsgálva az artrózisos és az artrózis nélküli csoportok között a funkció és az életminőség tekintetében. Ezen eredmények megfeleltek más szerzők kikaparással kezelt betegeinek eredményeivel és szignifikánsan jobbak voltak a rezekcióval kezelt betegek eredményeinél (Malawer és mtsai 1999). Ezek alapján azt feltételezhetjük, hogy korai artrózis kevésbé befolyásolja az életminőséget és a funkciót. A betegek a tumorműtétet követően kevésbé élik meg drámaian a szekunder artrózissal járó tüneteket, mint a primer artrózissal kezelt társaik.

Klinikai eredményeink alapján tehát az ideális csontpótló anyag azonnali mechanikai támaszt nyújt, oszteokonduktív és oszteoinduktív tulajdonságú és a csont mechanikai integritásának veszélyeztetése nélkül képes hosszú távon felszívódni és

csonttá átépülni. Ilyen ideális megoldás lehet bioaktív kerámiák alkalmazása, amelyek teljesítik ezeket a kritériumokat (Hollinger és mtsai 1986). A jövőben a küretázs utáni PMMA kitöltés helyettesíthető lehetne kedvezőbb oszteokonduktív, oszteoinduktív és rugalmassági tulajdonságú anyagok alkalmazásával (Theler és mtsai 2011). Amennyiben a szekunder artrózis a küretázs és PMMA kitöltés után alakul ki, akkor első lépésben érdemes a csontcementet csontforgácsra cserélni és a protézist csak második lépésben beültetni.

## 5.2 Kísérletes eredményeink megbeszélése

Jelen munka második felének alapfeltételezése az volt, hogy a PRP fokozza a csontgyógyulást kritikus méretű csontdefektusban nagy specifikus felületű kerámiával a CDHA scaffolddal együtt használva. Adataink demonstrálják, hogy a PRP-nek pozitív hatása van az újonnan képződött csont mennyiségére, melyet mikro-CT és szövettan segítségével mértünk. Ez a hatás hasonló volt ahhoz, melyet a mezenchimális őssejtekkel bevont CDHA kerámiák esetén figyeltünk meg. A két módszer együttes alkalmazása esetén azonban, mikor a mezenchimális őssejtekkel bevont CDHA kerámiához PRP-t is adtunk, további egymást erősítő hatást nem tudtunk megfigyelni.

Vizsgálatainkhoz felnőtt, nőstény (New Zealand White Rabbit) nyulakat választottunk. Választásunk az irodalom alapos áttekintése után esett erre az állatfajra. Ez az állatmodell egyaránt kiválóan alkalmas a fiziológiás csontregeneráció reprodukálható vizsgálatához, valamint különböző csontpótló anyagok valid vizsgálatához. Az ISO 10993-6-os felszívódó, emberben használható anyagokkal foglalkozó irányelve 1994-ből többek között hosszútávú tesztelésre a nyulakat ajánlotta 78 hétnél nem hosszabb implantátumviselési periódussal. A nyulak a legkisebb állatok, melyek az emberhez, a kutya és a macskához hasonlóan rendelkeznek Havers-féle csatornarendszerrel. Így a nyulak felhasználásával nyert eredmények egyaránt felhasználhatóak a humán- és az állatgyógyászatban (Kleinheinz és mtsai 2002)

Vizsgálatainkhoz nyulak radiusán kialakított defektusmodellt alkalmaztunk. Mivel a nyulaknál a radius és az ulna között egy úgynevezett radioulnaris synostosis van, így a radiuson kialakított defektus után az ulna mint egy belső sín viselkedett, és

további oszteoszintézisre nincs szükség. Munkacsoportunk korábbi vizsgálatai alapján 16 hetes megfigyelési időszakot választottunk (Geiger és mtsai 2005).

A csontképződést tradicionálisan hisztomorfometriai vizsgálatokkal ítéltük meg (Jaecques és mtsai 2004). Bizonyos festékek képesek a műanyagba ágyazott, csiszolós technikával készített vékony preparátumok felszíni rétegeibe bediffundálni, és ott a felszínt megfesteni. Ezáltal sejtes elemek, lágy szövetek és a csont is optimálisan jeleníthetőek meg. Korábban hasonló vizsgálatainkban is a Toluidin-Giemsa-festést választottuk (Geiger és mtsai 2007). Ezzel az eljárással jól elkülöníthető a mineralizált csontmátrix, az oszteoid, a porc és a kötőszövet. Jelen munkánkban a szövettani vizsgálat célja az újonnan képződött csont mennyiségének százalékos meghatározása és annak eloszlásának vizsgálata volt.

A mikro-CT használata háromdimenziós csontstruktúrák vizsgálatában 1989-es bevezetése óta a sztandard eljárások közé tartozik (Jaecques és mtsai 2004). Szinte minden csontnövekedéssel, csontgyógyulással foglalkozó munkacsoport használja a mikro-CT-t kvantitatív mérések elvégzéséhez (Geiger és mtsai 2005, Geiger és mtsai 2007, Sarkar és mtsai 2006). Ezzel a módszerrel a preparátumok károsítása nélkül pontosan meg lehet mérni az újonnan képződött csont mennyiségét, annak térbeli eloszlását, és lehetőség van szemléletes háromdimenziós rekonstrukció készítésére is. Mivel a vizsgálat nem destruktív, így lehetőség van a mérések után a preparátumok szövettani feldolgozására. Így lehetővé válik ugyanazon preparátumok radiológiai és morfológiai vizsgálata.

Tisztán oszteokonduktív csontpótló anyagok felhasználása esetén csak korlátozott mértékű csontképződésre számíthatunk. (Schnürer és mtsai 2003). Ennek megfelelően a különböző szövetépítési eljárások próbálják ezt a mérsékelt oszteokonduktív tulajdonságot javítani különféle sejtes és nem sejtes elemek felhasználásával. Különböző állatmodellekben igazolták (Fibbe 2002), hogy kritikus méretű csontdefektusok gyorsabban gyógyulnak, ha a csontpótló anyagokat BMSC-vel kombináljuk (Kasten és mtsai 2005). BMSC-t relatíve egyszerűen és könnyen tudjuk izolálni a csontvelő-aspirátumból, és a tenyésztése sem okoz problémát. Igény esetén exogén génekkel is könnyen transzfektálható (Southwood és mtsai 2004). Jelen munkánkban a munkacsoportunk által korábban már használt, jól bevált sejttizolálási és sejtenyésztési protokollt használtuk (Geiger és mtsai 2005). Korábbi vizsgálatainkból

jól ismertük ezen sejtek tenyésztési sajátosságait, és így optimális mennyiségű és minőségű (sejtmorfológia, sejtvitalitás) sejtet tudtuk vizsgálatainkhoz nyerni.

Sok, különböző típusú csontpótló anyag érhető el napjainkban a piacon. Az aktuális trendek szerint a felszívódó csontpótló anyagok a korszerűek. Ezek az anyagok mintegy állványzatként viselkednek, melyeken új saját csont tud képződni. Ezen állványzatok felszínén különböző sejtek és növekedési faktorok tudnak megtapadni és az új csont képződését serkenteni. Jelen munkánkhoz a CDHA kerámiát, mint csontpótló anyagot választottuk. Fontos szempont egy csontpótló anyag kiválasztásánál a biokompatibilitás. A kalciumfoszfát kerámiákra általában igaz, hogy a szervezet által jól tolerálhatóak, és nem váltanak ki idegentest típusú reakciókat (Finkemeier és mtsai 2002).

A csontképződés függ a választott scaffoldtól. KASTEN és munkatársai azt figyelték meg, hogy SCID-egereknek szubkután beültetett BMSC-vel bevont CDHA kerámiák felszínén szignifikánsan több csont képződött, mint a BMSC-vel bevont  $\beta$ -TCP kerámiák felszínén (Kasten és mtsai 2006). Fontos tényező egy adott kerámia lebomlási sebessége is. Ismert, hogy a különböző kalciumfoszfát kerámiák különbözőféleképpen bomlanak le (Yang és mtsai 2010). A szinterezéssel, ezer foknál magasabb hőmérsékleten előállított kalciumfoszfát kerámiák strukturálisan, oldhatóságban és részben kémiai összetételükben is különböznek a nem szinterezéssel előállított kalciumfoszfát kerámiáktól. A  $\beta$ -TCP-t szinterezési eljárással állították elő, ez élő szervezetben egy-két év alatt bomlik le. A lebontást oszteoklasztok és makrofágok végzik (Bohner 2001). A CDHA nem szinterezési eljárással készült, de megközelítőleg azonos kémiai összetétele van, mint a  $\beta$ -TCP-nek egy teljesen más kristályszerkezettel. A nagy specifikus felületű CDHA kerámiának körülbelül százszor nagyobb a specifikus felülete (SSA) mint a  $\beta$ -TCP-nek, mely fokozott fehérjemegkötő képességet jelent. A CDHA kerámia nagy specifikus felülete így egy erősebb és hosszabban tartó PRP megkötést tesz lehetővé, fokozva ezzel a vérlemezkék degranulációját és a növekedési faktorok felszabadulását (Bohner 2001).

A  $\beta$ -TCP a leggyakrabban használt, állati és humán kísérletekben egyaránt kedvelt csontpótló anyag (Kasten és mtsai 2003, Hauschild és mtsai 2005). Jelen vizsgálatunkhoz direkt egy új és innovatívnak számító csontpótló anyagot, a CDHA kerámiát választottuk. Ezt az anyagot állatkísérletben a mi munkacsoportunk próbálta ki

elsőként. Egy in vitro vizsgálatban, melyben különböző anyagok felszínén vizsgáltuk a BMSC-k oszteogén irányú indukcióját, sikerült igazolni, hogy a  $\beta$ -TCP-hez hasonlóan a CDHA kerámia felszínén is végbemegy az oszteogén differenciáció (Kasten és mtsai 2003). Később ezen tulajdonságot humán BMSC felhasználásával, immunhiányos egerek szubkután szöveteibe ültetett CDHA kerámiák felszínén in vivo is sikerült igazolni (Kasten és mtsai 2004)

De milyen az ideális csontpótló anyag? Az ideális csontpótló anyag a teljes defektust ki kell, hogy töltsse, megakadályozva a csontgyógyulást gátló szövetek, lágyrészek defektusba nyomulását. Az ideális anyagnak lehetővé kell tennie a sejtek mozgását, ezért porózusnak kell lennie, és kell egy adott pórusméret is. Az erek benövését is lehetővé kell tenni, mert hiányzó érképződés esetén csontképződés helyett inkább porcos kötőszövet képződését figyelhetjük meg. Fontos továbbá, hogy biokompatibilis legyen, és ne váltson ki immunológiai reakciókat. Ideális esetben kapcsolat alakul ki a fogadó szövetekkel, mely új sejtek képződését segíti elő, kialakítva az oszteokonduktív tulajdonságok mellett az oszteoinduktivitást és a rezorpciós képességet.

A mezenchimális őssejteket jól működő, egyszerű, reprodukálható módszer segítségével tudjuk izolálni a csontvelőből. Sűrűség-grádiens kihasználva centrifugálás segítségével először a mononukleáris sejteket választjuk ki a csontvelőből, majd a mezenchimális őssejteket a műanyag tenyésztőedény aljához való letapadás képessége alapján kiszűrjük a többi sejt közül (Reyes és mtsai 2001; Pittenger és mtsai 1999). Standard környezetben, kétdimenzionális in vitro monolayer sejt kultúra segítségével gyorsan szaporíthatóak, expansziós fázisban nem differenciálódnak, és az expanszió után a sejt kultúrákból könnyen kinyerhetők.

Ismert az irodalomban a trombocitában gazdag plazma (PRP) különböző sejt típusok proliferációját fokozó hatása (Lucarelli és mtsai 2003). Felhasználás előtt könnyű beszerezni az allogén trombocitában gazdag vérbankból. Rendelkezésre állnak ma már hordozható szeparálókitték is, melyek segítségével a felhasználás helyén gyorsan, egyszerűen lehet kis mennyiségű PRP-t előállítani a beteg saját véréből (Weibrich és mtsai 2003). Ezzel a lehetőséggel kizárható az allogén PRP alkalmazása esetén felmerülő esetleges immunválasz, és különböző fertőző ágensek átvitele.

A PRP különböző növekedési faktorokat tartalmaz, mint például PRP, PDGF, FGF, IGF, TGF- $\beta$ , EGF és VEGF (Weibrich és mtsai 2003; Weibrich és mtsai 2004). Doucet és munkatársai mezenchimális őssejtekben vizsgálták esetlegesen a PDGF $\alpha$ - és - $\beta$ , bFGF-, TGF-  $\beta$ II- valamint az IGF-receptorok jelenlétét (Doucet és mtsai 2005). Igazolták, hogy a mezenchimális őssejtek ezen receptorokkal rendelkeznek.

Kuznetsov és munkatársai kimutatták, hogy PDGF, EGF, TGF- $\beta$  és bFGF elleni neutralizáló antitestek gátolják a mezenchimális őssejtek kolóniaképző képességét. Kimutatták továbbá azt is, hogy a legnagyobb inhibitoros képessége a PDGF és a TGF elleni antitesteknek van (Kuznetsov és mtsai 1997). Ezek a kutatások azt igazolták, hogy ezek a PRP-ben nagy mennyiségben jelen lévő faktorok esszenciálisak az őssejtizolálásban és tenyésztésben.

A trombociták aktivizálásakor a benne lévő növekedési faktorok felszabadulnak. Gyakorlatunkban az irodalomban is elfogadott, fagyasztásos-felolvasztásos módszert használtuk, melynek segítségével felszabadulnak a növekedési faktorok a trombocitákból. Az állatkísérleteink előtt megvizsgáltuk az általunk előállított PRP-ben a trombocitaszámot és a PDGF és a TGF- $\beta$  koncentrációt, mely megfelelt az irodalmi adatoknak. Az általunk előállított PRP-ben a trombocitaszám  $1,0 \times 10^6/\mu\text{l}$  felett volt, mely ideális oszteogén irányú in vivo differenciációhoz (Weibrich és mtsai 2003, Weibrich és mtsai 2004). A sejtproliferáció emeléséhez ideális trombocitaszámot ezidáig nem határozták meg.

Alapkutatási eredmények bizonyítják, hogy a PRP elősegíti a csontgyógyulást (Kawase és mtsai 2003, Yamada 2004, Kovács és mtsai 2003, Gruber és mtsai 2003, Graziani és mtsai 2006). Klinikai eredmények továbbá azt mutatják, hogy a mandibuláris csontdefektusok pótlására használt csontgraftok PRP alkalmazásával gyorsabban épülnek be, mint PRP alkalmazása nélkül (Al Sukhun és mtsai 2007). Marhából származó spongiózus blokkokhoz adott PRP fokozza az új csont képződését nyulak esetében a nem kritikus méretű koponyacsont-defektusnál (Aghaloo 2004). Úgy tűnik tehát, hogy a PRP-nek autológ spongiózával együtt alkalmazva serkentő hatása van a csontos átépülés korai fázisára (Wiltfang és mtsai 2004). Megfigyelték továbbá, hogy elősegíti a csontgyógyulást diabeteses állatmodellekben is (Gandhi és mtsai 2006). Ha autológ spongiózával keverjük össze és aktiváljuk, akkor a PRP egy citokinekben és növekedési faktorokban gazdag gélt formál, melyeknek döntő szerepe van koordinált

sebgyógyulásban, az új erek képződésében és a szöveti regenerációban (Wiltfang és mtsai 2004, Fennis és mtsai 2004).

Az irodalmat kritikusan vizsgálva azonban azt kell megállapítanunk, hogy a trombocitában gazdag plazma csontgyógyulásra gyakorolt pozitív hatását nem mindegyik fajta scaffolddal kombinálva és nem mindegyik állatmodell esetében lehet megfigyelni. Kecskékben például spongiózus csonthoz adva a PRP nem fokozta a csontgyógyulást kritikus méretű csontdefektusban (Mooren és mtsai 2007).

$\beta$ -TCP-hez PRP-t adva nem tudtak fokozott csontgyógyulást megfigyelni sem gerinc fúziós modellen (Li és mtsai 2004), sem disznók kritikus méretű homlokcsont defektus modelljén, sem patkány állkapocs defektusának gyógyulásában (Wiltfang és mtsai 2004.) Csökkent csontképződést figyeltek meg PRP használata esetén kutya tibiájába ültetett titán implantátumok környezetében, és a PRP nem fokozta a csontosodást kutyába ültetett titán fogászati implantátumok környezetében sem (You és mtsai 2007, Vasconcelos és mtsai 2007). Egy nem kritikus méretű, patkány csontdefektus modellben a PRP nem tudta fokozni a csontosodást sem hidroxipatit, sem TCP partikulumokon (Plachokova és mtsai 2007). A csontgyógyulás későbbi szakaszában sem tudtak a szerzők pozitív PRP hatást igazolni (Wiltfang és mtsai 2004, Thor és mtsai 2007). Munkacsoportunk egy korábbi munkájában, melynek során SCID egerek bőre alá ültettünk be különböző fajtájú scaffoldokat PRP-vel bevonva, azt találtuk, hogy a PRP-nek jobb effektusa van az ektópiás csontképződésre a magas specifikus felületű CDHA kerámián, mint az alacsony specifikus felületű  $\beta$ -TCP-n (Kasten és mtsai 2006). Mivel a bőr alatti ektópiás csontképződés nem összehasonlítható a csontdefektusban történő csontképződéssel, emellett egy esetleges klinikai alkalmazás modellezésétől is távol áll, ezért úgy döntöttünk, hogy a PRP hatását a CDHA kerámia felszínén egy csöves csonton kialakított kritikus méretű csontdefektus-modellen is megvizsgáljuk. Azért választottunk kritikus méretű diafizeális defektust, mert a rosszabb vérellátásnak köszönhetően nehezebben gyógyul, mint egy metafizeális csontdefektus. (Ennek megfelelően a kontroll csoportként hagyott üres defektusok egyike sem gyógyult meg vizsgálatainkban.)

A PRP hatékonyságának fontos tényezője a PRP elkészítésének módszere, mivel az jelentősen befolyásolhatja a vérlemezkék és a növekedési faktorok koncentrációját (Weibrich és mtsai 2003), ezáltal pedig kihat annak oszteogén kapacitására (Wiltfang és

mtsai 2004). Ajánlások szerint a vérben található trombocita számhoz képest 3-5-szörös koncentrációemelkedést érdemes elérni PRP készítése esetén (Roldan és mtsai 2004). A magasabb vérlemezke koncentráció nem feltétlenül jelent magasabb növekedési faktor koncentrációt, mint például TGF- $\beta$ 1 esetén (Dugrillon és mtsai 2002). Továbbá a közelmúltban egy in vitro tanulmány kimutatta, hogy a növekedési faktorok koncentrációja fajfüggő, legmagasabb az emberi PRP-ben, majd a kecske és a patkány PRP növekedési faktor koncentrációja következik (van den Dolder 2006). A PRP degranulációja és így a növekedési faktorok felszabadulása tovább fokozható trombinnal kalcium-klorid jelenlétében (Lieberman és mtsai 2002). A lefagyasztás-felolvasztás folyamata is fokozza a degranulációt. Vizsgálatunk során sztandardizált módon mind a két degranulációt elősegítő módszert használtuk, mintáinkat lefagyasztottuk, majd felolvasztottuk, és az alkalmazás előtt pedig trombint is adtunk hozzá kalcium-klorid jelenlétében.

Igazolt tény, hogy a csontpótló kerámiák fibronectinnel történő bevonása elősegíti a csontképződés. Dennis és munkatársai igazolták, hogy a csontképző kerámiák felszínén körülbelül kétszer annyi sejt tud megtapadni, mint a fibronectinnel nem kezelt felszínén (Dennis és mtsai 1992). Ezen kívül azt is megfigyelték, hogy az ilyen módon előkezelt kerámiákon a csontképződés hamarabb beindul és gyorsabb. Mivel a kerámiák fibronectinnel végzett kezelése igen költséges, ezért számos munkacsoport végez kísérleteket a fibronectin humán szérummal történő helyettesítésével kapcsolatban. Mivel egyértelmű eredmények e kérdést illetően nincsenek az irodalomban (Vogel és mtsai 2006) ezért jelen munkánk során a fibronectin használata mellett maradtunk.

Összefoglalva a PRP szerepe továbbra is ellentmondásos marad. Számos tanulmány a PRP pozitív hatásáról számol be, főleg a csontgyógyulás korai fázisában, míg mások ezt a pozitív hatást nem tudták kimutatni. Az egymástól jelentősen eltérő felhasználási módszerek tovább nehezítik a különféle munkák eredményeinek összehasonlíthatóságát. A PRP csontgyógyulásra kifejtett hatását a következő faktorok befolyásolhatják: az alkalmazott biokerámia/scaffold fajtája, az adott faj típusa, az implantáció helye, a defektus mérete, a PRP készítés módja és annak aktiválása.

Feltételezzük, hogy a PRP támogatja az oszteogenezist prekursor sejtek jelenléte esetén. Vizsgálataink során azonban azt figyeltük meg, hogy ha a mezenchimális



őssejtekkel bevont CDHA kerámiához PRP-t is adunk, az nem fokozza tovább a csontképződést. A növekedési faktorok PRP-ben található összetétele és mennyisége (PDGF, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, IGF, EGF, ECGF) (Kawase és mtsai 2003) nem tudott erős oszteogén hatást kifejteni a kerámiára felvitt mezenchimális őssejtekre. Ez a megfigyelés talán azt jelenti számunkra, hogy a PRP-nek az új csont képződésére kifejtett hatása gyenge, és ezáltal kérdéses klinikai alkalmazása is. Már in vitro munkákban is felvetették (Arpornmaeklong és mtsai 2004; Gruber és mtsai 2004), hogy a PRP az oszteogén irányú differenciációra gátlólag hat. Arpornmaeklong és munkatársa mezenchimális őssejtek 3 dimenziós tenyészetében mutatták ki, hogy PRP alkalmazása után csökken az alkalikus-foszfátáz aktivitás és a kalcium-lerakódás. Gruber és munkatársai kimutatták, hogy igen magas trombocita-koncentrációt alkalmazva csökken az MSC-k oszteogén differenciációja, mely hatást PDGF ellenes antitestekkel lehet kikapcsolni. A PDGF tehát fokozza a sejtproliferációt, de a sejteket differenciálatlan állapotban tartja. Másrészt előfordulhat, hogy a defektusba a CDHA kerámia felszínén bejuttatott mezenchimális őssejtek már erősen indukálva voltak az oszteogén differenciáció irányába, és ehhez a PRP már további pozitív effektust hozzátenni nem tudott. A radiusból az oszteotómiás károsodás hatására növekedési faktorok és prekursor sejtek szabadultak fel (Lieberman és mtsai 2002), melyek szintén elégséges stimulust jelenthetnek a beültetett mezenchimális őssejteknek, és így a PRP már nem tud további hatást kifejteni.

Az a tény, hogy az allogén PRP CDHA kerámia felszínén mezenchimális őssejt beültetése nélkül is ugyanolyan csontképződést tudott indukálni, mint a mezenchimális őssejt, csontdefektusok pótlásánál klinikai jelentőséggel bír. Az allogén PRP-t fagyasztva lehet tárolni, és így bármikor lehet használni az állület kialakulására hajlamos betegeknél (pl. dohányosok), vagy oszteoporotikus betegeknél, ahol a csontállomány mennyisége alapvetően csökkent. PRP-t lehet esetlegesen direkt csontdefektusokba juttatva is használni, ahol fokozza az új csont képződését.

Hisztomorfometriai vizsgálatunkkal az üresen hagyott CDHA kerámiák esetén 11 %-os csontképződést figyeltünk meg, 26 %-os csontképződést pedig a CDHA+MSC+PRP csoportban. Lousia és munkatársai korall scaffoldot használtak mezenchimális őssejtekkel hasonló állatmodellben, és 30 %-os csontképződést találtak az őssejtekkel kezelt csoportban, 8 %-os csontképződést pedig az üresen hagyott korall

kerámia csoportban (Lousia és mtsai 1999). Geiger és munkatársai 28 %-os csontképződést találtak mikro-CT-vel mérve korall scaffoldon az általunk is használt nyúl radius defektus modelljét használva 12 hét után, melyet VEGF adásával 60 %-osra tudtak növelni (Geiger és mtsai 2005). Petite és munkatársai bárány metatarsus modellen, korall scaffoldot használva, 16 hét után, hisztomorfológiai elemzés után 23 %-os spongióza és 13 %-os kortikális csont kialakulását figyelték meg (Petite és mtsai 2002). Az irodalmi adatokhoz képest jelen munkánkban a csontképződés mértéke alacsony volt mind a mezenchimális őssejt nélkül beültetett scaffold csoportban, mind pedig a mezenchimális őssejttel és/vagy PRP-vel kezelt scaffold csoportokban. Mi lehet ennek az oka? Ez összefüggésben lehet az (i) PRP-vel (korábban már elemeztük), (ii) a kerámiákra felvitt mezenchimális őssejtek mennyiségével, (iii) magával a CDHA kerámiával, és a (iv) csontképződés mérésének módszerével. A kerámiákra felvitt mezenchimális őssejtek mennyisége ( $5 \times 10^6$ ) megfelel más munkákban használt sejtszámoknak, sejteink oszteogén irányú differenciációjának lehetőségét pedig in vitro előtanulmányunkban igazoltuk (Kasten és mtsai 2004, Vogel és mtsai 2006). Ezért azt gondoljuk, hogy az általunk használt mezenchimális őssejtek minősége jó volt, és mennyiségük sem volt alacsony. Egy korábbi munkánk során a magas specifikus felületű (high-SSA) CDHA kerámia ektópiás implantációját követően fokozott csontregenerációs képességet figyeltük meg a  $\beta$ -trikálcium-foszfáthoz képest (Kasten és mtsai 2006), de kisebb regenerációs képességet a korall scaffoldhoz viszonyítva (Geiger és mtsai 2007). Szintén fontos tényező, mely befolyásolhatja az új csont képződését, a scaffold felszívódási sebessége: a korall scaffold gyorsabban felszívódik, mint a CDHA kerámia. Ha a scaffold gyorsan felszívódik, több hely van az új csont képződéséhez, ha azonban túl gyorsan szívódik fel, akkor helyén gyulladásos reakció jelentkezik, és a biomechanikai stabilitás megszűnik. Nincs tehát konszenzus a csontképződéshez optimális rezorpció sebességéről. További vizsgálatok szükségesek tehát ahhoz, hogy a scaffoldokat jobban össze tudjuk egymással hasonlítani, és ezáltal a csontpótláshoz az ideálisat ki tudjuk választani. Az eredményeket befolyásoló fontos tényező továbbá az a módszer, mellyel a csontképződés mértékét meghatározzuk. Különböző módszerek és vizsgálók más és más eredményt hozhatnak ugyanarról a mintáról is (például a szegmentálási folyamat a mikro-CT vizsgálatok során). Ezért azt gondoljuk, hogy hasznos lehet, ha ugyanabban a munkában többféle mérési módszert is használunk,

például jelen vizsgálatunk során a háromdimenziós mikro-CT vizsgálatokat kétdimenziós szövettani elemzéssel egészítettük ki.

Jelen munka nem csak az általános csontképződést vizsgálta, hanem annak térbeli eloszlását a defektuson belül és a beültetett scaffold felszívódását is. Először is fokozott csontképződést figyeltünk meg a radius proximális és disztális rezekciós felszíneihez közel és az intakt ulna mellett is. Ez a tény alátámasztja azt a feltételezést, hogy a szervezet saját, érintetlen sejtjei kulcsfontosságúak a beültetett sejtekre és a bejuttatott PRP-ből származó növekedési faktorokra adott biológiai válaszban. Megfigyeltük továbbá, hogy a mezenchimális őssejtek és PRP külön-külön vagy együttes alkalmazása esetén fokozódott a CDHA kerámia felszívódása. Ez annak a fontosságát hangsúlyozza, hogy bioaktív anyagok (növekedési faktorok, mezenchimális őssejtek) hozzáadása a remodellinget fokozza, mely a defektus átépülésének kulcsfontosságú mozzanata. A növekedési faktorok és a mezenchimális őssejtek progenitor sejteket és oszteoklasztokat vonzanak a defektus régiójába, beindítva ezzel is a remodellinget (Quarto és mtsai 2001). Az ortopéd sebészetben a hosszú csöves csontokon belüli elaszticitáscsökkenés fokozott törésveszéllyel jár. Ideális ezért egy olyan biodegradábilis kerámia alkalmazása lenne, mely gyorsan lebomlik ugyan, de nem gyorsabban, mint ahogy helyén új csont képződik, mely a folyamatos remodelling miatt helyreállítja a csont homogén elaszticitását.

Felmerülhet, hogy az allogén és kevert PRP használata nem szerencsés, mert meghamisítja az eredményeket, és egy esetleges klinikai alkalmazás esetén is limitáló tényező. Mi azonban ezt nem így gondoljuk, és kísérletünk tervezésénél tudatosan választottuk ezt a fajta felhasználási módot. Kevert és allogén PRP használata esetén a PRP minősége jobban sztandardizálható. A módszer csökkenti a PRP minőségének variabilitását és így használatával jobb eredmények érhetőek el, mintha minden egyes egyed saját véréből előállított készítményt adtunk volna vissza. Az allogén PRP használata nem okoz klinikailag és szövettanilag mérhető immunológiai reakciót. Tisztában vagyunk azzal a ténnyel, hogy az általunk használt módszerek nem elegendőek egy esetleges immunológiai reakció teljes kizárására, de azok meglete igen valószínűtlen. Az immunológiai válasz hiánya megfelel korábbi tanulmányok eredményeinek is, ahol allogén PRP szerepét vizsgálták a szöveti- és csontgyógyulásban. Ennek talán az az oka, hogy a trombociták nem expresszálnak

immunológiai releváns felszíni antigéneket, mint amilyen például a HLA rendszer (Pietramaggiori és mtsai 2006, Pietramaggiori és mtsai 2008). Az allogén PRP másik előnye, hogy klinikai alkalmazás esetén azonnal rendelkezésre áll, és az ellátás során autológ PRP előállításával nem kell bajlódni. Munkánk másik esetleges hiányossága, hogy egyéb növekedési faktort tartalmazó kontroll csoportot, mint például a BMP-2, nem képeztünk, pedig egy direkt összehasonlítás érdekes lett volna a PRP oszteogén potenciáljának megítélése céljából. Jelen munka célja azonban az volt, hogy a PRP csontgyógyulásra gyakorolt hatását vizsgálja mezenchimális őssejtekkel kombinálva magas specifikus felületű CDHA kerámia felszínén, nem pedig az, hogy különféle növekedési faktorokkal hasonlítsa össze. Ez talán egy későbbi munkánk feladata lehet.

## 6. Következtetések

Munkánk első részében retrospektív vizsgálatunk célja az volt, hogy megfigyeljük és összehasonlítsuk a szubkondráisan elhelyezkedő óriássejtes csonttumorok kikaparása után kialakult üreg kitöltésére használt eltérő sebészeti technikákat, valamint a zömített csontforgács és csontcement hatását az alsó végtagi teherviselő ízületekben kialakuló szekunder degeneratív elváltozásokra. Az eltelt néhány évben lefolytatott vizsgálataink során intézetünkben, a Semmelweis Egyetem Általános Orvostudományi Karának Ortopédiai Klinikáján általunk kezelt, intézetünk Csonttumor Regiszterében nyilvántartott, rendszeresen ellenőrzött betegeink anyagát dolgoztuk fel.

Eredményeink alapján fokozott a hajlam az artrózisra csont graft beültetés esetén az első két postoperatív évben, később azonban a csontos átépülés lezárulta után további degeneratív elváltozás nem várható. A cementtel kezelt csoportban ennek a fordítottja igaz: az artrózis kialakulásának valószínűsége alacsony volt az első két évben, majd az idő múlásával egyre több artrózis megjelenésével kell számolni. Tanulmányunk másik eredménye az az összefüggés, mely leírja, hogy a szubkondrális csont érintettsége egyértelműen összefügg a későbbi ízületi szekunder degeneratív elváltozások kialakulásával. Szignifikánsan több szekunder artrózist találtunk az 50 százaléknál nagyobb szubkondrális kiterjedésű daganat esetén mindkét vizsgálati időpontban.

Klinikai eredményeink alapján tehát az ideális csontpótló anyag azonnali mechanikai támaszt nyújt, oszteokonduktív és oszteoinduktív tulajdonságú és a csont mechanikai integritásának veszélyeztetése nélkül képes hosszú távon felszívódni és csonttá átépülni. Ilyen ideális megoldás lehet bioaktív kerámiák alkalmazása, amelyek teljesítik ezeket a kritériumokat.

A nagyméretű csontdefektusok rekonstrukciója az ortopédia és a baleseti sebészet legnehezebb feladatai közé tartozik. Az ilyen defektusok kezelésében a mai napig az autológ csont átültetése számít az arany standardnak. Az utóbbi időben az úgynevezett szövetépítő technikák (Tissue Engineering) egyre nagyobb figyelmet kapnak, melyekkel csontpótló anyagokat sejtekkel, növekedési faktorokkal kombinálva próbálunk gyógyulást elérni. Fontos az ilyen összejt alapú technikáknál, hogy a szükséges mennyiségű sejtet gyorsan, megfelelő mennyiségben tudjuk előállítani, és

azok funkciója megmaradjon. Tudomásunk szerint csak szórványos ismeretek vannak a trombocitában gazdag plazma esetleges felhasználásának lehetőségeiről a kritikus méretű csontdefektusok gyógyításában. Munkánk második felében egy ilyen csontpótlásra alkalmas bioaktív kerámia állatkísérletes vizsgálatát végeztük. Megvizsgáltuk a PRP hatását a kritikus méretű csontdefektus gyógyulására autológ mezenchimális őssejtekkel, és a fent említett nagy specifikus felületű CDHA kerámiával kombinálva. Vizsgálatunkhoz egy új-zélandi fehér nőtény nyúl radiusán kialakított kritikus méretű diafizális csontdefektusmodellt választottunk. A főbb vizsgált paraméterek pedig a csontosodást követő biomechanikai stabilitás, az újonnan képződött csont mennyisége és a beültetett kerámia felszívódásának mértéke voltak, melyeket négy pontos nem destruktív hajlítási vizsgálattal, micro-CT vizsgálattal és szövettani vizsgálattal határoztunk meg.

Adataink demonstrálják, hogy a PRP-nek pozitív hatása van az újonnan képződött csont mennyiségére, melyet mikro-CT és szövettan segítségével mértünk. Ez a hatás hasonló volt ahhoz, melyet a mezenchimális őssejtekkel bevont CDHA kerámiák esetén figyeltünk meg. A két módszer együttes alkalmazása esetén azonban, mikor a mezenchimális őssejtekkel bevont CDHA kerámiához PRP-t is adtunk, további egymást erősítő hatást nem tudtunk megfigyelni. Jelen munka nem csak az általános csontképződést vizsgálta, hanem annak térbeli eloszlását a defektuson belül és a beültetett scaffold felszívódását is. Először is fokozott csontképződést figyeltünk meg a radius proximális és disztális rezekciós felszíneihez közel és az intakt ulna mellett is. Ez a tény alátámasztja azt a feltételezést, hogy a szervezet saját, érintetlen sejtjei kulcsfontosságúak a beültetett sejtekre és a bejuttatott PRP-ből származó növekedési faktorokra adott biológiai válaszban. Megfigyeltük továbbá, hogy a mezenchimális őssejtek és PRP külön-külön vagy együttes alkalmazása esetén fokozódott a CDHA kerámia felszívódása. Ez annak a fontosságát hangsúlyozza, hogy bioaktív anyagok (növekedési faktorok, mezenchimális őssejtek) hozzáadása a remodellinget fokozza, mely a defektus átépülésének kulcsfontosságú mozzanata.

Munkánk során a következő új megállapításokat tettük:

1. Szubkondrálisan elhelyezkedő óriássejtes csonttumorkok kikaparása után gyakran alakul ki artrózis az első két posztoperatív évben, ha csontforgácsot

használunk a defektus kitöltésére, később azonban, a csontos átépülés lezárulta után további degeneratív elváltozás nem várható. A cementtel kezelt csoportban ennek a fordítottja igaz: az artrózis kialakulásának valószínűsége alacsony volt az első két évben, majd az idő múlásával egyre több artrózis megjelenésével kell számolni.

2. Tanulmányunk másik eredménye az az összefüggés, mely leírja, hogy a szubkondrális csont érintettsége egyértelműen összefügg a későbbi ízületi szekunder degeneratív elváltozások kialakulásával. Szignifikánsan több szekunder artrózt találtunk az 50 százaléknál nagyobb szubkondrális kiterjedésű daganat esetén mindkét vizsgálati időpontban.
3. A PRP fokozott csontképződést produkál (melyet szövettani és mikro-CT vizsgálatokkal is kimutattunk) CDHA kerámiákon nyulak kritikus méretű csontdefektusában 16 hét után.
4. Biomechanikai különbséget nem találtunk az üresen hagyott és a PRP-vel kezelt CDHA kerámiával kitöltött csoportok között.
5. A mezenchimális őssejtek szintén fokozták a csontképződést CDHA kerámia felszínén, de a PRP és MSC együttes alkalmazása esetén nem tudtunk további additív hatást megfigyelni. A jövőben tehát nem szükséges MSC adása a PRP-hez az általunk használt nyúl-modellben.
6. Megfigyeltük továbbá, hogy a CDHA kerámia felszívódása fokozódott a PRP, MSC és PRP/MSC alkalmazása esetén, de a csoportok között különbség nem volt. Összességében elmondhatjuk tehát, hogy a trombocitában gazdag plazma fokozza a csontosodást nyúl diafizéális defektusmodelljében CDHA kerámia felszínén.
7. Eredményeink továbbá felvetik az allogén PRP használatának lehetőségét humán csontdefektusok és álízületek kezelésében.

## 7. Összefoglalás

A masszív csontdefektusok a mai napig komoly problémát jelentenek a rekonstruktív sebészet számára. Munkánk első felében retrospektív vizsgálatunk célja az volt, hogy összehasonlítsuk a szubkondrálisan elhelyezkedő óriássejtes csonttumorok kikaparása után kialakult üreg kitöltésére használt zömített csontforgács és csontcement hatását az alsó végtagi teherviselő ízületekben kialakuló degeneratív elváltozásokra. Jelen munkánk második felében azt vizsgáltuk, hogy a PRP fokozza-e a csontgyógyulást nyúlón kialakított kritikus méretű diafizális csontdefektusban. A csontdefektust az új, nagy specifikus felületű kalcium-hiányos hidroxiapatit (CDHA) kerámiával töltöttük ki, melynek felszínére vagy allogén PRP-t, vagy mezenchimális őssejteket (MSC), vagy mindkettőt vittünk fel. Küretázst és csont graft beültetést 44 esetben végeztünk, míg 36 esetben a kikaparást követően cementes kitöltést alkalmaztunk. A 24 hónapos posztoperatív vizsgálat során szignifikánsan kevesebb degeneratív változás volt tapasztalható a cementes kitöltés után a csont graft beültetéshez képest. Az 50 hónapos utánkövetés után, valamint később sem volt szignifikáns különbség a két csoport között. Ezen eredmények azt mutatják, hogy 24 hónap elteltével felgyorsultak a degeneratív folyamatok a cementtel kitöltött defektusok környezetében elhelyezkedő ízületekben. A PRP fokozta az új csont képződését az üresen hagyott CDHA kerámiákhoz képest 16 hét után. A mezenchimális őssejtekkel kezelt csoportban hasonló eredményekre jutottunk, mint a PRP-vel kezelt csoportban. A PRP és az MSC együttes alkalmazása esetén azonban nem tudtunk egymást erősítő hatást igazolni. Megfigyeltük továbbá, hogy a PRP, MSC és PRP/MSC alkalmazása esetén fokozódik a CDHA kerámia felszívódása. Az ideális csontpótló anyag azonnali mechanikai támaszt nyújt, oszteokonduktív és oszteoinduktív tulajdonságú és a csont mechanikai integritásának veszélyeztetése nélkül képes hosszú távon felszívódni és csonttá átépülni. Összességében elmondhatjuk tehát, a trombocitában gazdag plazma fokozza a csontosodást nyúl diafizális defektusmodelljében CDHA kerámia felszínén. A mezenchimális őssejtek szintén fokozták a csontképződést CDHA kerámia felszínén, de a PRP és MSC együttes alkalmazása esetén nem tudtunk további additív hatást megfigyelni. Eredményeink továbbá támogatják allogén PRP használatát a humán csontdefektusok és állizületek kezelésében.



## Summary

Massive bone defects constitute a major challenge to reconstructive surgery. The first aim of this retrospective study was to compare and assess the effect of bone grafting and cementing techniques – two common applications used in the treatment of subchondral giant cell tumours of bone (GCTs) – on the development of degenerative changes in the weight-bearing joints of the lower extremity. The hypothesis investigated was that PRP improves bone healing of a critical-size diaphyseal radius defect in a rabbit model. The bone defect was filled with a high-surface ceramic scaffold, calcium-deficient hydroxyapatite (CDHA), with the addition of allogenic PRP, mesenchymal stem cells (MSC) or both. Eighty patients were included in this follow-up study, 44 of whom underwent curettage followed by bone grafting, and 36 who had curettage followed by cementation. At the 24-month post-operative examination, significantly less degenerative change was found in patients with bone cement than in those with bone grafting. At the 50-month and later (range: 50–148 months) post-operative examination, however, no significant differences were found between the two groups, indicating that there was a significant acceleration of degenerative changes in the cemented group after the 24month follow-up. PRP yielded better bone formation than the empty CDHA scaffold as determined by both histology and microcomputer tomography after 16 weeks, whereas no difference was observed on biomechanical testing. Similar behavior was found in samples with MSC; however, the combination of MSC and PRP did not further improve bone healing. Furthermore, the resorption of CDHA was improved by the addition of PRP, MSC and MSC/PRP, but there were no differences between the groups. The areas of bone formation were greater in areas adjacent to the bone resection areas and towards the intact ulna. In the light of our clinical results, the optimal filling material should provide an immediate mechanical support, should be osteoconductive and osteoinductive and should have the capacity to be resorbed and replaced by host bone in the long-term without jeopardising the mechanical integrity of the bone. The ideal solution would be the use of bioactive ceramics, which fulfill all these criteria. In conclusion, PRP improves bone healing in a diaphyseal rabbit model on CDHA. This study supports the allogenic use of PRP for bone healing as an off-the-shelf therapy.

## 8. Irodalomjegyzék

Aghaloo TL, Moy PK, Freymiller EG. (2004) Evaluation of platelet-rich plasma in combination with anorganic bovine bone in the rabbit cranium: a pilot study. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 19(1): 59-65.

Anderson, J. M. (2005) The future of biomedical materials. *Hench Symposium*.

Anract P, De Pinieux G, Cottias P, Pouillart P, Forest M, Tomeno B. (1998) Malignant giant-cell tumours of bone. Clinico-pathological types and prognosis: a review of 29 cases. *Int Orthop*, 22: 19-26.

Aranguren XL, Luttun A, Clavel C, Moreno C, Abizanda G, Barajas MA, Pelacho B, Uriz M, Arana M, Echavarri A, Soriano M, Andreu EJ, Merino J, Garcia-Verdugo JM, Verfaillie CM, Prosper F. (2007) In vitro and in vivo arterial differentiation of human multipotent adult progenitor cells. *Blood*, 109: 2634-2642.

Arinzech TL, Peter SJ, Archambault MP, van den Bos C, Gordon S, Kraus K, Smith A, Kadiyala S. (2003) Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect. *J Bone Joint Surg Am*. 85: 1927-1935.

Arpornmaeklong P, Kochel M, Depprich R, Kubler NR, Wurzler KK. (2004) Influence of platelet-rich plasma (PRP) on osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells. An in vitro study. *Int.J Oral Maxillofac.Surg*, 33: 60-70.

Arrington ED, Smith WJ, Chambers HG, Bucknell AL, Davino NA. (1996) Complications of iliac crest bone graft harvesting. *Clin Orthop*, 329: 300-9.

Awad HA, Butler DL, Boivin GP, Smith FN, Malaviya P, Huibregtse B, Caplan A. (1999) I. Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon. *Tissue Eng*, 5: 267-277.

Bay JO, Bignon YJ, Gros P, Jancovici R, Desangles F, Dubayle P, Hauteville D. (1999) Giant cell tumor of the sternum. Report of a case with a 17q isochromosome. *Rev. Rhum. Engl. Ed*. 66: 49-52.

Blackley HR, Wunder JS, Davis AM, White LM, Kandel R, Bell RS. (1999) Treatment of giant-cell tumors of long bones with curettage and bone-grafting. *J Bone Jt Surg Am.* 81: 811-820.

Bohner M. (2000) Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. *Injury* 31 Suppl, 4: 37-47.

Bohner M. (2001) Physical and chemical aspects of calcium phosphates used in spinal surgery. *Eur Spine J*, 10: 114-121.

Bohner, M. (2001) Calcium phosphate emulsions: Possible applications. *Key Eng Mater*, 192-195: 765-768.

Bostrom MP, Saleh KJ, Einhorn TA. (1999) Osteoinductive growth factors in preclinical fracture and long bone defects models. *Orthop Clin North Am*, 30: 647-58.

Bouxsein ML, Turek TJ, Blake CA, D'Augusta D, Li X, Stevens M, Seeherman HJ, Wozney JM. (2001) Recombinant human bone morphogenetic protein-2 accelerates healing in a rabbit ulnar osteotomy model. *J Bone Joint Surg Am* 83-A, Nr. 8, 1219-30.

Brandner H, Späth K. (2001) Extrakorporale Stoßwellentherapie bei Knochenheilungsstörungen *Trauma Berufskrankh* 3, Nr. 2, 253-261.

Brehm W. (2007) Stammzelltherapie von Sehnenläsionen beim Pferd. *Congress Proceedings, XVII.Tagung über Pferdekrankheiten im Rahmen der Equitana*, Essen, 87-88.

Brown P. (2005) Blood infectivity, processing and screening tests in transmissible spongiform encephalopathy. *Vox Sanguinis*, 89: 63-70.

Campanacci M, Baldini N, Boriani S, Sudanese A. (1987) Giant-cell tumor of bone. *J. Bone Joint Surg. Am.* 69: 106-114.

Campanacci M, Giunti A, Olmi R. (1975) Giant-cell tumours of bone. A study of 209 cases with long term follow-up. *Ital J Orthop Traumatol*, 1: 249-277.

Cancedda R, Bianchi G, Derubeis A, Quarto R. (2003) Cell Therapy for Bone Disease: A Review of Current Status. *Stem Cells*, 21: 610-619.

Carano RA, Filvaroff EH. (2003) Angiogenesis and bone repair. *Drug Discov Today* 8, Nr. 21, 980-9.

Chawla S, Henshaw R, Seeger L, Choy E, Blay JY, Ferrari S. (2013) Safety and efficacy of denosumab for adults and skeletally mature adolescents with giant cell tumour of bone: interim analysis of an open-label, parallel-group, phase 2 study. *Lancet Oncol*, 14(9): 901-8.

Chen TH, Su YP, Chen WM. (2005) Giant cell tumors of the knee: subchondral bone integrity affects the outcome. *Int Orthop*, 29: 30-4.

Cheng JC, Johnston JO. (1997) Giant cell tumor of bone. Prognosis and treatment of pulmonary metastases. *Clin Orthop*, 205-214.

Choi BH, Im CJ, Huh JY, Suh JJ, Lee SH. (2004) Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in autogenous bone graft. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 33(1): 56-9.

Cornell CN, Lane J, Chapman M, Merkow R, Seligson D, Henry S, Gustilo R, Vincent K. (1991) Multicenter trial of collagraft as bone graft substitute. *J Orthop Trauma*, 5: 1-8.

Cummins CA, Scarborough MT, Enneking WF. (1996) Multicentric giant cell tumor of bone. *Clin Orthop*, 245-252.

Dahlin DC. (1985) Giant cell tumor of bone: Highlights of 407 cases. *Am J. Roentgenol*. 144, 955-960.

Damien C, Parsons R. (1991) Bone graft and bone graft substitutes: review of current technology and applications. *J Appl Biomat*, 2:187-208.

de Boer HH. (1988) The history of bone grafts. *Clin Orthop Rel Res*, 226: 292-298.

De Smedt M, Copin G, Boeri C, Dosch JC, Dupuis M, and Marcellin L. (1999) A case of a aggressive giant-cell tumor with multiple bone metastases. *Rev. Chir. Orthop*.

Reparatrice. Appar. Mot. 85: 293-296.

Dennis JE, Carbillet JP, Caplan AI, Charbord P. (2002) The STRO-1+ marrow cell population is multipotential. *Cells Tissues Organs*, 170: 73-82.

Dennis JE, Haynesworth SE, Young RG, Caplan AI. (1992) Osteogenesis in marrow-derived mesenchymal cell porous ceramic composites transplanted subcutaneously: Effect of fibronectin and laminin on cell retention and rate of osteogenic expression. *Cell Transplant*, 1: 23-32.

Doucet C, Ernou I, Zhang Y, Llense JR, Begot L, Holy X, Lataillade JJ. (2005) Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: A safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J Cell Physiol*, 205: 228-236.

Dreinhofer KE, Rydholm A, Bauer HC, Kreicbergs A. (1995) Giant cell tumours with fracture at diagnosis. *J Bone Jt Surg Br*, 77: 189-193.

Dugrillon A, Klüter H. (2002) Topical application of platelets for improved wound healing. *Blood Ther Med*, 3(1): 21-6.

Eckardt JJ, Grogan TJ. (1986) Giant cell tumor of bone. *Clin Orthop*, 45-58.

Enneking WF. (1987) *Musculoskeletal tumor surgery*. New York, Churchill Livingstone.

Erler K, Yildiz C, Baykal B, Atesalp AS, Ozdemir MT, Basbozkurt M. (2005) Reconstruction of defects following bone tumor resections by distraction osteogenesis. *Arch.Orthop.Trauma Surgery*, 125: 177-183.

Fennis JP, Stoelinga PJ, Jansen JA. (2004) Mandibular reconstruction: a histological and histomorphometric study on the use of autogenous scaffolds, particulate cortico-cancellous bone grafts and platelet rich plasma in goats. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 33(1): 48-55.

Fibbe WE. (2002) Mesenchymal stem cells. A potential source for skeletal repair. *Ann Rheum Dis* 61, Nr. 2, ii29-31.

Finkemeier CG. (2002) Bone-grafting and bone-graft substitutes. Current concepts review. *J Bone Joint Surg Am*, 84-A: 454-464.

Fleming JE, Cornell CN, Muschler GF. (2000) Bone cells and matrices in orthopedic tissue engineering. *Orthop Clin North Am*, 31: 357-374.

Fontana S, Olmedo DG, Linares JA, Guglielmotti MB, Crosa ME. (2004) Effect of platelet-rich plasma on the peri-implant bone response: an experimental study. *Implant Dent*, 13: 73-78.

Forsyth RG, De Boeck G, Bekaert S. (2008) Telomere biology in giant cell tumour of bone. *J Pathol*, 214: 555-563.

Fortier LA. (2005) Stem Cells: Classifications, Controversies, and Clinical Applications. *Vet Surg*, 34: 415-426.

Frassica FJ, Gorski JP, Pritchard DJ, Sim FH, Chao EYS. (1993) A comparative analysis of subchondral replacement with polymethylmethacrylate or autologous bone graft in dogs. *Clin Orthop Rel Res*, 293: 339-378.

Friedenstein AJ, Petrakova KV, und Kurolesova A. (1968) I. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 6: 230-247.

Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, und Petrakova KV. (1966) Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Exp.Morphol.* 16: 381-390.

Gandhi A, Dumas C, O'Connor JP, Parsons JR, Lin SS. (2006) The effects of local platelet rich plasma delivery on diabetic fracture healing. *Bone*, 38(4): 540-6.

Gaston CL, Grimer RJ, Parry M, Stacchiotti S, Dei Tos AP, Gelderblom H. (2016) Current status and unanswered questions on the use of denosumab in giant cell tumor of bone. *Clin Sarcoma Res*, 6(1): 15.

Gauthier O, Bouler JM, Aguado E, Pilet P, Daculsi G. (1998) Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: Influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth. *Biomaterials*, 19: 133-139.

Geiger F, Bertram H, Berger I, Lorenz H, Wall O, Eckhardt C, Simank HG, Richter W. (2005) Vascular endothelial growth factor gene-activated matrix (VEGF165-GAM) enhances osteogenesis and angiogenesis in large segmental bone defects. *J Bone Miner Res* 20, Nr. 11, 2028-35.

Geiger F, Lorenz H, Xu W, Szalay K, Kasten P, Claes L, Augat P, Richter W. (2007) VEGF producing bone marrow stromal cells (BMSC) enhance vascularization and resorption of a natural coral bone substitute. *Bone* 41, Nr. 4, 516-22.

Gerrand C, Athanasou N, Brennan B, Grimer R, Judson I, Morland B. (2016) UK guidelines for the management of bone sarcomas. *Clin Sarcoma Res*, 6: 7.

Glowacki J. (1998) Angiogenesis in fracture repair. *Clin Orthop Relat Res*, 355: 82-9.

Gosain AK, Song LS, Santoro T, Weihrauch D, Bosi BO, Corrao MA. (2000) Effects of transforming growth factor-beta and mechanical strain on osteoblast cell counts: an in vitro model for distraction osteogenesis. *Plast Reconstr Surg*. 105: 130-136.

Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. (1991) Osteogenic potential of cultureexpanded rat marrow cells as assayed in vivo with porous calcium phosphate ceramic. *Biomaterials* 12: 253-258.

Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. (1991) The origin of bone formed in composite grafts of porous calcium phosphate ceramic loaded with marrow cells. *Clin Orthop Rel Res*, 269: 274-283.

Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. (1991) The osteogenic potential of culture-expanded rat marrow mesenchymal cells assayed in vivo in calcium phosphate ceramic blocks. *Clin Orthop Rel Res*, January: 298-311.

Goshima J. (1991) Ectopic bone formation by composite graft of culture-expanded human marrow cells and porous calcium phosphate ceramic. *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi*. 65: 34-43.

Gouin F, Rochwerger AR, Di MA, Rosset P, Bonneville P, Fiorenza F. (2014) Adjuvant treatment with zoledronic acid after extensive curettage for giant cell tumours of bone. *Eur J Cancer*, 50(14): 2425-31.

Graziani F, Ivanovski S, Cei S, Ducci F, Tonetti M, Gabriele M. (2006) The in vitro effect of different PRP concentrations on osteoblasts and fibroblasts. *Clin Oral Implants Res*, 17(2): 212-9.

Greenwald AS, Boden SD, Goldberg VM, Yaszemski M, Heim CS. (2006) Bone-Graft Substitutes: Facts, Fictions & Applications. American Academy of Orthopaedic Surgeons, 73rd Annual Meeting, Chicago, Illinois, 223.

Gregory CA, Reyes E, Whitney MJ, Spees JL. (2006) Enhanced engraftment of mesenchymal stem cells in a cutaneous wound model by culture in allogenic species-specific serum and administration in fibrin constructs. *Stem Cells*, 24: 2232-2243.

Gronthos S, Simmons PJ. (1995) The growth factor requirements of STRO-1positive human bone marrow stromal precursors under serum-deprived conditions in vitro. *Blood*, 85: 929-940.

Gruber AW, Sabitzer RJ, Gorzer H, Hainfellner JA, Ungersbock K. (1999) Acute symptom transverse laminectomy for a benign osteoclastoma of the thoracic spine--case report and review of the literature. *Zentralbl. Neurochir*. 60: 93-99.

Gruber R, Karreth F, Kandle, B, Fuerst G, Rot A, Fischer MB, Watzek G. (2004) Platelet-released supernatants increase migration and proliferation, and decrease osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells under in vitro conditions. *Platelets*, 15: 29-35.

Hallfeldt KK, Stützel H, Puhlmann M, Kessler S, Schweiberer L. (1995) Sterilization of partially demineralized bone matrix: the effects of different sterilization techniques on osteogenic properties. *J Surg Res*, 59: 614-620.



Hauschild G, Merten HA, Bader A, Uhr G, Deivick A, Meyer-Lindenberg A, Fehr M. (2005) Bioartificial bone grafting: Tarsal joint fusion in a dog using a bioartificial composite bone graft consisting of  $\beta$ -tricalciumphosphate and platelet rich plasma - a case report. *Vet Comp Orthop Traumatol*, 18: 1-3.

Hauschild M, Machulla HKG, Reichel H, Schaaf A, Hein W. (1996) Immunologische Reaktionen nach allogener Knochentransplantation. *Osteologie*, 3.

Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. (1992) Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone*, 13: 81-88.

Heng BC, Cao T, Stanton LW, Robson P, Olsen B. (2004) Strategies for directing the differentiation of stem cells into the osteogenic lineage in vitro. *J Bone Miner. Res.* 19: 1379-1394.

Hisatome T, Yasunaga Y, Ikuta Y, Fujimoto Y. (2002) Effects on articular cartilage of subchondral replacement with polymethylmethacrylate and calcium phosphate cement. *J Biomed Mater Res*, 59: 490-498.

Hollinger JO, Battistone GC. (1986) Biodegradable bone repair materials. Synthetic polymers and ceramics. *Clin Orthop*, 207: 290-305.

Hopp SG, Dahners LE, Gilbert JA. (1989) A study of the mechanical strength of long bone defects treated with various autograft substitutes. An experimental investigation in the rabbit. *J Orthop Res*, 7: 579-584.

Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, Muul L, Hofmann T. (2002) Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 8932-8937.

Hüvös AG. (1979) Bone Tumors: Diagnosis, Treatment and Prognosis. Philadelphia, W.B. Sanders.

Jadlowiec JA, Celil AB, Hollinger JO. (2003) Bone tissue engineering: recent advances and promising therapeutic agents. *Expert Opin.Biol.Ther.* 3: 409-423.

Jaecques SV, Van Oosterwyck H, Muraru L, Van Cleynenbreugel T, De Smet E, Wevers M, Naert I. (2004) Individualised, micro CT-based finite element modelling as a tool for biomechanical analysis related to tissue engineering of bone. *Biomaterials* 25, Nr. 9, 1683-96

Jaffe HL, Lichtenstein L, Portis RB. (1940) Giant cell tumor of bone. Its pathologic appearance, grading, supposed variants and treatment. *Arch. Pathol.* 30: 993-1031.

Jiang Y, Balkrishna NJ, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. (2002) Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 4-7: 41-49.

Johnston JO. (1987) Treatment of a giant cell tumor by aggressive curettage and packing with bone cement. In: Enneking WF (eds) *Limb salvage in musculoskeletal oncology*. Churchill Livingstone, New York, 512-515.

Jones CB, Mayo KA. (2005) Nonunion treatment: iliac crest bone graft techniques. *J Orthop Trauma* 19, Nr. 10, 11-3.

Joshi A, Kostakis GC. (2004) An investigation of post-operative morbidity following iliac crest graft harvesting. *Br Dent J* 196: 167-171.

Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. (2002) *Histologie. Lehrbuch der Cytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie des Menschen*. Springer Verlag, Berlin. Ed. 5.

Kallela I, Laine P, Suuronen R, Ranta P, Iizuka T, Lindqvist C. (1999) Osteotomy site healing following mandibular sagittal split osteotomy and rigid fixation with polylactide biodegradable screws. *Int.J.Oral Maxillofac.Surg.* 28: 166-170.

Kasten P, Luginbühl R, van Griensven M, Barkhausen T, Krettek C, Böhner M. (2003) Comparison of human bone marrow stromal cells seeded on calciumdeficient hydroxyapatite,  $\beta$ -tricalcium phosphate and demineralized bone matrix. *Biomaterials*, 24(15): 2593-603.

Kasten P, Luginbühl R, Vogel J, Niemeyer P, Weiss S, Van Griensven M, Krettek C, Böhner M, Bosch U, Tonak M. (2004) Induction of bone tissue on different matrices: an in vitro and a in vivo pilot study in the SCID mouse *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 142, Nr. 4, 467-75.

Kasten P, Vogel J, Luginbühl R, Niemeyer P, Tonak M, Lorenz H, Weiss S, Fellenberg J, Leo A, Simank HG, Richter W. (2005) Ectopic bone formation associated with mesenchymal stem cells in a resorbable calcium deficient hydroxyapatite carrier. *Biomaterials*, 26: 5879-5889.

Kasten P, Vogel J, Luginbühl R, Niemeyer P, Weiss S, Schneider S, Kramer M, Leo A, Richter W. (2006) Influence of platelet-rich plasma on osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and ectopic bone formation in calcium phosphate ceramics. *Cells Tissues Organs* 183, Nr. 2, 68-79.

Katz E, Nyska M, Okon E, Zajicek G, Robin G. (1987) Growth rate analysis of lung metastases from histologically benign giant cell tumor of bone. *Cancer*, 59: 1831-1836.

Kawase T, Okuda K, Wolff LF, Yoshie H. (2003) Platelet-rich plasma-derived fibrin clot formation stimulates collagen synthesis in periodontal ligament and osteoblastic cells in vitro. *J Periodonto*, 74(6): 858-64.

Kellgren JH, Lawrence JS. (1957) Radiological assessment of osteo-arthritis. *AnnRheum Dis*, 16: 494-502.

Kitoh H, Kitakoji T, Tsuchiya H, Mitsuyama H, Nakamura H, Katoh M, Ishiguro N. (2004) Transplantation of marrow-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma during distraction osteogenesis - a preliminary result of three cases. *Bone*, 35: 892-898.

Kiuru J, Viinikka L, Myllylä G, Personen K, Perheentupa J. (1991) Cytoskeleton-dependent release of human platelet epidermal growth factor. *Life Sci*, 49: 1997-2003.

Kleinheinz J, Wiesmann HP, Stratmann U, Joos U. (2002) Beurteilung der Angiogenese und Osteogenese unter dem Einfluss von Vascular endothelial growth factor (VEGF). *Mund Kiefer Gesichtschir* 6, Nr. 3, 175-182.

Knowles H, Athanasou N. (2008) Hypoxia-inducible factor is expressed in giant cell tumour of bone and mediates paracrine effects of hypoxia on monocyte-osteoclast differentiation via induction of VEGF. *J Pathol.* 215(1): 56-66.

Kobayashi E, Setsu N. (2015) Osteosclerosis induced by denosumab. *Lancet*, 385(9967): 539.

Kovacs K, Velich N, Huszar T, Szabo G, Semjen G, Reiczigel J. (2003) Comparative study of beta-tricalcium phosphate mixed with platelet-rich plasma versus beta-tricalcium phosphate, a bone substitute material in dentistry. *Acta Vet Hung*, 51(4): 475-84.

Kraus KH, Kirker-Head C. (2006) Mesenchymal Stem Cells and Bone Regeneration. *Vet Surg*, 35: 232-242.

Krebsbach PH, Kuznetsov SA, Satomura K, Emmons RV, Rowe DW, Robey PG. (1997) Bone formation in vivo: comparison of osteogenesis by transplanted mouse and human marrow stromal fibroblasts. *Transplantation*, 63: 1059-1069.

Kruyt MC, Dhert WJ, Oner WJ, van Blitterswijk CA, Verbout A, de Bruijn JD. (2007) Analysis of ectopic and orthotopic bone formation in cell based tissue-engineered constructs in goats. *Biomaterial*, 28: 1798-1805.

Kuner EH, Berwarth H, Lücke SV. (1996) Treatment principles in aseptic pseudarthrosis *Orthopade* 25, Nr. 5, 394-404.

Kuznetsov SA, Friedenstein AJ, Robey PG. (1997) Factors required for bone marrow stromal fibroblast colony formation in vitro. *British J of Haematol.* 97: 561-570.

Kuznetsov SA, Grosheva AG, Friedenstein AJ. (1989) Osteogenic properties of adhesive cells from mouse bone marrow Dexter cultures. *Bull Exp Biol Med.* 108: 236-238.

Kuznetsov SA, Mankani MH, Robey PG. (2000) Effect of serum on human bone marrow stromal cells: ex vivo expansion and in vivo bone formation. *Transplantation*, 70: 1780- 1787.

Labs K, Perka C, Schmidt RG. (2001) Treatment of stages 2 and 3 giant-cell tumor. Arch Orthop Trauma Surg, 121: 83-86.

Lakshmipathy U, Verfaillie C. (2005) Stem cell plasticity. Blood Reviews, 19: 29-38.

Landesberg R, Roy M, Glickman R. (2000) Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. J Oral Maxillofac Surg. 58: 297-300.

Lane JM, Sandhu HS. (1987) Current approaches to experimental bone grafting. Orthop Clin North Am 18, Nr. 2, 213-25.

Lau CP, Huang L, Wong KC, Kumta SM. (2013) Comparison of the anti-tumor effects of denosumab and zoledronic acid on the neoplastic stromal cells of giant cell tumor of bone. Connect Tissue Res, 54(6): 439-49.

Lau CP, Wong KC, Huang L, Li G, Tsui SK, Kumta SM. (2015) A mouse model of luciferase-transfected stromal cells of giant cell tumor of bone. Connect Tissue Res, 56(6): 493-503.

Laurencin C, Khan Y, El-Amin S F. (2006) Bone graft substitutes. Expert Rev Med Devices 3: 49-57.

Le Blanc K, Pittenger M. (2005) Mesenchymal stem cells: progress toward promise. Cytotherapy, 7: 36-45.

LeGeros RZ. (2002) Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. Clin Orthop, 395(Feb): 81-98.

Lennon DP, Haynesworth SE, Bruder SP, Jaiswal N, Caplan AI. (1996) Human and animal mesenchymal progenitor cells from bone marrow: Identification of serum for optimal selection and proliferation. In Vitro Cell Dev Biol. 32: 602-611.

Li H, Zou X, Xue Q, Egund N, Lind M, Bunger C. (2004) Anterior lumbar interbody fusion with carbon fiber cage loaded with bioceramics and platelet-rich plasma. An experimental study on pigs. Eur Spine J, 13(4): 354-8.

Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. (2002) The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. J.Bone Joint Surg.Am, 84-A: 1032-1044.

Liebich HG. (1999) Funktionelle Histologie der Haussäugetiere, 3. Auflage Schattauer, ISBN 3-7945-1899-0

Liu HS, Wang JW. (1998) Treatment of giant cell tumor of bone: a comparison of local curettage and wide resection. Chang Keng I Hsuey, 21: 37-43.

Louisia S, Stromboni M, Meunier A, Sedel L, Petite H. (1999) Coral grafting supplemented with bone marrow. J Bone Joint Surg Br, 81(4): 719-24.

Lu J, Descamps M, Dejou J, Koubi G, Hardouin P, Lemaitre J, Proust JP. (2002) The biodegradation mechanism of calcium phosphate biomaterials in bone. J.Biomed.Mater.Res. 63: 408-412.

Lucarelli E, Beccheroni A, Donati D, Sangiorgi L, Cenacchi A, Del Vento AM, Meotti C, Bertoja AZ, Giardino R, Fornasari PM, Mercuri M, Picci P. (2003) Platelet-derived growth factors enhance proliferation of human stromal stem cells. Biomaterials, 24: 3095-3100.

Ma Y, Xu W, Yin H, Huang Q, Liu T, Yang X. (2015) Therapeutic radiotherapy for giant cell tumor of the spine: a systemic review. Eur Spine J, 24(8): 1754-60.

Malawer MM, Bickels J, Meller I, Buch RG, Henshaw RM, Kollender Y. (1999) Cryosurgery in the treatment of giant cell tumor. A long-term followup study. Clin Orthop, 176-188.

Mangi AA, Noiseux N, Kong D, He H, Rezvani M, Ingwall JS, Dzau VJ. (2003) Mesenchymal stem cells modified with Act prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. Nat Med. 9: 1195-1201.

Mankani MH, Kuznetsov SA, Fowler B, Kingman A, Robey PG. (2001) In vivo bone formation by human bone marrow stromal cells: effect of carrier particle size and shape. Biotechnol.Bioeng. 72: 96-107.

Manolagas SC. (2000) Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 21, Nr. 2, 115-37.

Martin DR, Cox NR, Hathcock TL, Niemeyer GP, Baker HJ. (2002) Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. *Exp Hematol*. 30: 879-886.

Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. (1998) Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 85(6): 638-46.

Mattei TA, Ramos E, Rehman AA, Shaw A, Patel SR, Mendel E. (2014) Sustained long-term complete regression of a giant cell tumor of the spine after treatment with denosumab. *Spine J*, 14(7): 15-21.

Mattila P, Knuuttila M, Kovanen V, Svanberg M. (1999) Improved bone biomechanical properties in rats after oral xylitol administration. *Calcif Tissue Int* 64(4): 340-4.

McGough RL, Rutledge J, Lewis V, Lin PP, Yasko AW. (2005) Impact severity of local recurrence in giant cell tumor of bone. *Clin Orthop Rel Res*, 438: 116-122.

Mimeault M, Batra SK. (2006) Concise Review: Recent advances on the significance of stem cells in tissue regeneration and cancer therapies. *Stem Cells*, 24: 2319-2345.

Mooren RE, Merckx MA, Bronkhorst EM, Jansen JA, Stoelinga PJ. (2007) The effect of platelet-rich plasma on early and late bone healing: an experimental study in goats. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 36(7): 626-31.

Muller DA, Beltrami G, Scoccianti G, Campanacci DA, Franchi A, Capanna R. (2016) Risks and benefits of combining denosumab and surgery in giant cell tumor of bone-a case series. *World J Surg Oncol*, 14(1): 281.

Müller G, Müller A, Jonuleit H, Steinbrink K, Szalma C, Paragnik L, Lingnau K, Schmidt E, Knop J, Enk AH. (2000) Fetal calf serum-free generation of functionally

active murine dendritic cells suitable for in vivo therapeutic approaches. *J Invest Dermatol.* 114: 142-149.

Nakamura Y, Wang X, Xu C, Asakura A, Yoshiyama M, From AHL, Zhang J. (2007) Xenotransplantation of long-term-cultured swine bone marrowderived mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 25: 612-620.

Ng KW, Romas E, Donnan L, Findlay DM. (1997) Bone biology. *Baillieres Clin Endocrinol Metab.* 11: 1-22.

Niethard FU, Pfeil J. (2003) Orthopädie, 4. Auflage Thieme Verlag, ISBN 3-13-130814-1, 316-317.

Oyama MA, Merola V, Eurell TE. (2005) Cardiac cellular transplantation: transarterial myoblast transplantation in dogs. *Intern J Appl Res Vet Med.* 3: 102-115.

Ozaki T, Hillmann A, Lindner N, Winkelmann W. (1997) Cementation of primary aneurysmal bone cysts. *Clin Orthop Rel Res*, 337: 240-248.

Petite H, Hannouche D. (2002) Marrow stromal stem cells for repairing the skeleton. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 19: 83-101.

Petite H, Viateau V, Bensaid W, Meunier A, de Pollak C, Bourguignon M. (2000) Tissue-engineered bone regeneration. *Nat Biotechnol*, 18(9): 959-63.

Pietramaggiori G, Kaipainen A, Czezug JM, Wagner CT, Orgill DP, Fuerst G. (2006) Freeze-dried platelet-rich plasma shows beneficial healing properties in chronic wounds. *Wound Repair Regen* 14(5): 573-80.

Pietramaggiori G, Scherer SS, Mathews JC, Alperovich M, Yang HJ, Neuwalder J. (2008) Healing modulation induced by freeze-dried platelet-rich plasma and micronized allogenic dermis in a diabetic wound model. *Wound Repair Regen*, 16(2): 218-25.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. (1999) Multilineage potential of adult mesenchymal stem cells. *Science*, 284: 143-147.



Plachokova AS, van den Dolder J, Stoelinga PJ, Jansen JA. (2007) Early effect of platelet-rich plasma on bone healing in combination with an osteoconductive material in rat cranial defects. *Clin Oral Implants Res*, 18(2): 244-51.

Pollard JW. (2001) Tumour-stromal interactions. Transforming growth factor-beta isoforms and hepatocyte growth factor/scatter factor in mammary gland ductal morphogenesis. *Breast Cancer Res*. 3: 230-237.

Prockop DJ. (1997) Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*, 276: 71-4.

Puelo DA. (2003) Biotherapeutics in orthopaedic medicine - accelerating the healing process? *Biodrugs*, 17: 301-314.

Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A. (2001) Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Eng J Med*, 344: 385-6.

Radin EL, Martin RB, Burr DB, Caterson B, Boyd RD, Goodwin C. (1984) Effects of mechanical loading on the tissues of the rabbit knee. *J Orthop Res*, 2: 221-234.

Radin EL, Rose RM. (1986) Role of subchondral bone in the initiation and progression of cartilage damage. *Clin Orthop*, 213: 34-40.

Rai B, Oest ME, Dupont KM, Ho KH, Teoh SH, Guldberg RE. (2007) Combination of platelet-rich plasma with polycaprolactone-tricalcium phosphate scaffolds for segmental bone defect repair. *J Biomed Mater Res A*. 81: 888-899.

Ranly DM, Lohmann CH, Andreacchio D, Boyan BD, Schwartz Z. (2007) Platelet-rich plasma inhibits demineralized bone matrix-induced bone formation in nude mice. *J Bone Joint Surg Am*. 89: 139-147.

Reddy GK, Stehno-Bittel L, Hamade S, Enwemeka CS. (2001) The biomechanical integrity of bone in experimental diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*, 54(1): 1-8.

Renard AJ, Veth RP, Pruszczynski M, Wobbles T, Lemmens JA, van Horn JR. (1994) Giant cell tumor of bone: oncologic and functional results. *J. Surg. Oncol.* 57: 243-251.

Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM. (2001) Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood*, 98(9): 2615-25.

Roldan JC, Jepsen S, Miller J, Freitag S, Rueger DC, Acil Y. (2004) Bone formation in the presence of platelet-rich plasma vs. bone morphogenetic protein-7. *Bone*, 34(1):80-90.

Rueger JM. (1998) Knochenersatzmittel - Heutiger Stand und Ausblick. *Orthopäde* 2: 72-79.

Ruggieri P, Mavrogenis AF, Ussia G, Angelini A, Papagelopoulos PJ, Mercuri M. (2010) Recurrence after and complications associated with adjuvant treatments for sacral giant cell tumor. *Clin Orthop Rel Res*, 468(11): 2954-61.

Sakkers RJB, Van der Heul RO, Kroon HM, Taminiau AHM, Hogendoorn PCW. (1997) Late malignant transformation of a benign giant-cell tumor of bone. A case report. *J Bone Joint Surg Am.* 79: 259-62.

Salunke AA, Chen Y, Chen X, Tan JH, Singh G, Tai BC. (2015) Does pathological fracture affect the rate of local recurrence in patients with a giant cell tumour of bone? A meta-analysis. *Bone Jt J*, 97-b(11): 1566-71.

Sanjay BK, Kadhi SM. (1998) Giant cell tumour of bone with pulmonary metastases. A report of three cases. *Int Orthop*, 22: 200-204.

Sápi Z, Antal I, Pápai Z, Szendrői M, Mayer Á, Jakab K, Pajor L, Bodó M. (2002) Diagnosis of soft tissue tumors by fine-needle aspiration with combined cytopathology and ancillary techniques. *Diagnostic Cytopathology*, 26:(4) 232-242.

Sarkar MR, Augat P, Shefelbine SJ, Schorlemmer S, Huberlang M, Claes L, Kinzl L, Ignatius A. (2006) Bone formation in a long bone defect model using a platelet-rich plasma-loaded collagen scaffold. *Biomaterials*, Nr. 9, 1817-1823.

Schnürer SM, Gopp U, Kühn KD, Breusch SJ. (2003) Bone substitutes Orthopade 32, Nr. 1, 2-10.

Sciot R, Dorfman H, Brys P, Dal Cin P, DeWever I, Fletcher C. (2000) Cytogenetic–morphologic correlations in aneurysmal bone cyst, giant cell tumor of bone and combined lesions. A report from the CHAMP study group. Mod Pathol. 13: 1206-1210.

Segura J, Albareda J, Bueno AL, Nuez A, Palanca D, Seral F. (1997) The treatment of giant cell tumors by curettage and filling with acrylic cement. Long-term functional results. Chir. Organi. Mov. 82: 373-380.

Siebenrock KA, Unni KK, Rock MG. (1998) Giant-cell tumour of bone metastasising to the lungs. A long-term follow-up. J. Bone Joint Surg. Br. 80: 43-47.

Slatter D. (1993) Textbook of small animal surgery. Volume 1. W. B. Saunders Company, Philadelphia. Ed. 2.

Slatter D. (1993) Textbook of small animal surgery. Volume 2. W. B. Saunders Company, Philadelphia. Ed. 2.

Soost F. (1996) Historischer Überblick der Knochenersatz- und Implantatmaterialien in der craniofacialen Chirurgie. Osteologie, 5: 135-143.

Sotiropoulou PA, Perez SA, Salagianni M, Baxevanis CN, Papamichail M. (2006) Letter to the editor: Cell culture medium composition and translational adult bone marrow-derived stem cell research. Stem Cells, 24: 1409-1410.

Southwood LL, Frisbie DD, Kawcak CE, McIlwraith CW. (2004) Delivery of growth factors using gene therapy to enhance bone healing. Vet Surg 33, Nr. 6, 565-78.

Stute N, Holtz K, Bubenheim M, Lange C, Blake F, Zander AR. (2004) Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use. Exp Hematol. 32: 1212-1225.

Suit H, Spiro I. (1999) Radiation treatment of benign mesenchymal disease. Semin. Radiat. Oncol. 9: 171-178.

Szendrői M, Antal I, Perlaky Gy. (2000) Mid-foot reconstruction following involvement of five bones by giant cell tumor. *Skeletal Radiol.* 29: 664-667.

Szendrői M, Cser I, Mészáros T. (1989) Óriássejtes tumorokkal szerzett tapasztalataink. *Magy. Traum. Ortop.* 32: 151-160.

Szendrői M. (1992) Adjuvante Therapie (Phenol, Knochenzement) bei den Riesenzelltumoren. *Zeitschrift für Orthop.* 130: 95-99.

Theler JM. (2011) Bone tissue substitutes and replacements. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, 19(4): 317-22.

Thomas D, Henshaw R, Skubitz K, Chawla S, Staddon A, Blay JY. (2010) Denosumab in patients with giant-cell tumour of bone: an open-label, phase 2 study. *Lancet Oncol*, 11(3): 275-80.

Thor A, Franke-Stenport V, Johansson CB, Rasmusson L. (2007) Early bone formation in human bone grafts treated with platelet-rich plasma: preliminary histomorphometric results. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 36(12): 1164-71.

Tuli SM, Gupta KB. (1981) Bridging of large chronic osteoperiosteal gaps by allogeneic decalcified bone matrix implants in rabbits. *J Trauma* 21, Nr. 10, 894-8.

Ueda Y, Imai K, Tsuchiya H, Fujimoto N, Nakanishi I, Katsuda S, Seiki M, Okada Y. (1996) Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B) is expressed in multinucleated giant cells of human giant cell tumor of bone and is associated with vascular invasion. *Am. J. Pathol.* 148: 611-622.

Unni K. (1996) Dahlin's Bone Tumors: Giant Cell Tumor, Chapter.19. Fifth Edition. Lippincott-Raven Philadelphia.

van den Dolder J, Mooren R, Vloon AP, Stoelinga PJ, Jansen JA. (2006) Platelet-rich plasma: quantification of growth factor levels and the effect on growth and differentiation of rat bone marrow cells. *Tissue Eng* 12(11): 3067-73.

Van der Heijden L, van de Sande MA, Dijkstra PD. (2012) Soft tissue extension increases the risk of local recurrence after curettage with adjuvants for giant-cell tumor of the long bones. *Acta Orthop*, 83(4): 401-5.

van der Meulen J, Koerten HK. (1994) Inflammatory response and degradation of three types of calcium phosphate ceramic in a non-osseous environment. *J.Biomed.Mater.Res.* 28: 1455-1463.

Vasconcelos Gurgel BC, Goncalves PF, Pimentel SP, Ambrosano GM, Nociti Junior FH, Sallum EA. (2007) Platelet-rich plasma may not provide any additional effect when associated with guided bone regeneration around dental implants in dogs. *Clin Oral Implants Res* 18(5): 649-54.

Verstraete KL, Lang P. (2000) Bone and soft tissue tumors: the role of contrast agents for MR imaging. *Eur J Radiol*, 34(3): 229-46.

Vogel JP, Szalay K, Geiger F, Kramer M, Richter W, Kasten P. (2006) Platelet-rich plasma improves expansion of human mesenchymal stem cells and retains differentiation capacity and in vivo bone formation in calcium phosphate ceramics. *Platelets*, 17(7): 462-9.

Volk SW, Diefenderfer DL, Christopher SA, Haskins ME, Leboy PS. (2005) Effects of osteogenic inducers on cultures of canine mesenchymal stem cells. *Am J Vet Res.* 66: 1729-1737.

Ware JE Jr, Sherbourne CD. (1992) The MOS 36-item short form health survey (SF-36). *Med Care*, 30: 473-483.

Weibrich G, Hansen T, Kleis T, Buch R, Hitzler WE. (2004) Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone*, 34: 665-671.

Weibrich G, Kleis WK, Hafner G, Hitzler WE, Wagner W. (2003) Comparison of platelet, leukocyte, and growth factor levels in point-of-care platelet-enriched plasma, prepared using a modified Curasan kit, with preparations received from a local blood bank. *Clin Oral Implants Res*, 14: 357-362.

Weissmann IL. (2000) Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: Barriers and opportunities. *Science*, 287: 1442-1446.

Welch RD, Berry BH, Crawford K, Zhang H, Zobitz M, Bronson D, Krishnan S. (2002) Subchondral defects in caprine femora augmented with in situ setting hydroxyapatite cement, polymethylmethacrylate, or autogenous bone graft: biomechanical and histomorphological analysis after two-years. *J Orthop Res*, 20: 464-472.

Wiesmann HP, Joos U, Meyer U. (2004) Biological and biophysical principles in extracorporal bone tissue engineering. Part II. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 33: 523-530.

Wiltfang J, Kloss FR, Kessler P, Nkenke E, Schultze-Mosgau S, Zimmermann R. (2004) Effects of platelet-rich plasma on bone healing in combination with autogenous bone and bone substitutes in critical-size defects. *Clin Oral Implants Res*, 15(2): 187-93.

Wittbjer J, Palmer B, Thorngren KG. (1982) Osteogenetic properties of reimplanted decalcified and undecalcified autologous bone in the rabbit radius. *Scand J Plast Reconstr Surg*, 16(3): 239-44.

Wong M, Tuan RS. (1993) Nuserum, a synthetic serum replacement, supports chondrogenesis of embryonic chick limb bud mesenchymal cells in micromass culture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 29A: 917-922.

Xu H, Niu X, Zhang Q, Hao L, Ding Y, Li Y. (2013) Subchondral bone grafting reduces degenerative change of knee joint in patients of giant cell tumor of bone. *ChinMed J (Engl)*, 126: 3053-6.

Yamada Y, Ueda M, Naiki T, Takahashi M, Hata K, Nagasaka T. (2004) Autogenous injectable bone for regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma: tissue-engineered bone regeneration. *Tissue Eng*, 10(5-6): 955-64.

Yang P, Wang C, Shi Z, Huang X, Dang X, Li X, Lin SF, Wang K. (2010) rhVEGF 165 delivered in a porous beta-tricalcium phosphate scaffold accelerates bridging of critical-sized defects in rabbit radii. *J Biomed Mater Res A* 92, Nr. 2, 626-40.

Yin Y, Gilula LA, Kyriakos M, Manske P. (1995) Giant-cell tumor of the distal phalanx of the hand in a child. *Clin Orthop*, 200-207.

You TM, Choi BH, Li J, Jung JH, Lee HJ, Lee SH. (2007) The effect of platelet-rich plasma on bone healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss: a pilot study in the dog tibia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 103(4): e8-12.

Yu J, Ustach C, Kim HR. (2003) Platelet-derived growth factor signaling and human cancer. *J Biochem Mol Biol*. 36: 49-59.

Yu X, Xu M, Xu S, Su Q. (2013) Clinical outcomes of giant cell tumor of bone treated with bone cement filling and internal fixation, and oral bisphosphonates. *Oncol Lett*, 5(2): 447-51.

Zechner W, Tangl S, Tepper G, Furst G, Bernhart T, Haas R. (2003) Influence of platelet-rich plasma on osseous healing of dental implants: a histologic and histomorphometric study in minipigs. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 18: 15-22.

Zimmermann R, Arnold D, Strasser E, Ringwald J, Schlegel A, Wiltfang J, Eckstein R. (2003) Sample preparation technique and white cell content influence the detectable levels of growth factors in platelet concentrates. *Vox Sanguinis*, 85: 283-289.

## 9. Saját publikációk jegyzéke

### Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények

Niemeyer P, **Szalay K**, Luginbühl R, Südkamp NP, Kasten P. (2010) Transplantation of human mesenchymal stem cells in a non-autogenous setting for bone regeneration in a rabbit critical-size defect model. *Acta Biomater*, 6(3):900-8.

IF:4,824

Kasten P, Vogel J, Geiger F, Niemeyer P, Luginbühl R, **Szalay K**. (2008) The effect of platelet-rich plasma on healing in critical-size long-bone defects. *Biomaterials*, 29(29):3983-92.

IF:6,646

Geiger F, Lorenz H, Xu W, **Szalay K**, Kasten P, Claes L, Augat P, Richter W. (2007) VEGF producing bone marrow stromal cells (BMSC) enhance vascularization and resorption of a natural coral bone substitute. *Bone*, 41(4):516-22.

IF:3,966

**Szalay K**, Antal I, Kiss J, Szendroi M. (2006) Comparison of the degenerative changes in weight-bearing joints following cementing or grafting techniques in giant cell tumour patients: medium-term results. *Int Orthop*, 30(6):505-9.

IF:0,977

Vogel JP, **Szalay K**, Geiger F, Kramer M, Richter W, Kasten P. (2006) Platelet-rich plasma improves expansion of human mesenchymal stem cells and retains differentiation capacity and in vivo bone formation in calcium phosphate ceramics. *Platelets*, 17(7):462-9.

IF:1,679



**Egyéb – nem az értekezés témájában megjelent - eredeti közlemények**

Antal I, Kiss J, Perlaky T, **Szalay K**, Vancsó P, Oláh Z, Sápi Z, Pápai Z, Szendrői M. (2014) Resection and reconstruction in cases of musculoskeletal soft tissue sarcomas. *Magy Onkol*, 58(1):32-6.

Kiss J, Antal I, Perlaky T, **Szalay K**, Oláh Z, Vancsó P, Révész Z, Rahóty P, Lestár B, Entz L, Szendrői M. (2014) Limb saving surgery in cases of bone sarcomas. *Magy Onkol*, 58(1):37-46.

Szendrői M, Antal I, Kiss J, Perlaky T, **Szalay K**. (2014) Contemporary management of bone tumors at Semmelweis University. *Magy Onkol*, 58(2):88-93.

Antal I, Szokoly M, **Szalay K**, Skaliczki G, Szél T, Szendrői M. (2013) Metrimed és Protetim cementezett csípőprotézisek túlélési eredményei 10 évet meghaladó utánkövetéses vizsgálatunk alapján. *Magyar Traumatológia Ortopédia Kézsebészet Plasztikai Sebészet*, 56:(4) pp. 273-282.

Holnapy G, **K Szalay**, Szendrői M. (2012) A csípő arthroplasztika tribológiai vonatkozásai. *Magyar Traumatológia Ortopédia Kézsebészet Plasztikai Sebészet*, 55:(3) pp. 185-194.

Antal I, **Szalay K**, Kiss J, Sápi Z, Szendrői M. (2009) DNS-tartalom és proliferációs index mint az óriássejtes csonttumorok prognosztikus tényezői *Magyar Traumatológia Ortopédia Kézsebészet Plasztikai Sebészet*, 52:(2) pp. 139-147.

Skaliczki G, Antal I, Kiss J, **Szalay K**, Skaliczki J, Szendroi M. (2005) Functional outcome and life quality after endoprosthetic reconstruction following malignant tumours around the knee. *Int Orthop*, 29(3):174-8.

IF:0,676

Skaliczki G, Antal I, Kiss J, **Szalay K**, Szendrői M. (2005) Középtávú életminőség vizsgálat és funkcionális eredmények térdízületi tumor endoprotézis beültetés után. Magyar Traumatológia Ortopédia Kézsebészet Plasztikai Sebészet, 48:(1) pp. 43-51.

## **10. Köszönetnyilvánítás**

Kísérleteinket a Heidelbergi Ruprecht Karl Egyetem Ortopédia Klinikáján végeztük. A CDHA kerámiacilindereket a Dr. h.c. Robert Mathys Alapítvány bocsátotta rendelkezésünkre. Mikro-CT vizsgálatainkat Ulmban, az ottani Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik Intézetben végeztük. Értekezésem végén szeretném kifejezni köszönetemet és hálámat mindazoknak, akik az eddig elvezető többéves munkámban önzetlen és pótolhatatlan segítséget nyújtottak:

Programvezetőmnek, témavezetőmnek Dr. Szendrői Miklós egyetemi tanárnak, az Ortopédiai Klinika igazgatójának, akivel már több mint egy évtizedes közös klinikai munka is összeköt, és aki PhD munkámat számtalan jó tanáccsal, hasznos ötlettel, bátorító ösztönzéssel támogatta, valamint az értekezés, ill. a közlemények elkészítésénél időt nem kímélve és fáradságot nem ismerve segítségemre volt,

Dr. Kiss Jánosnak és Dr. Perlaky Tamásnak, akik mindig megértéssel vállalták át a többletmunka terhét,

végezetül, de nem utolsó sorban köszönettel tartozom családom tagjainak, mindenek előtt feleségemnek, megértésükért, türelmükért.